

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Actividad ribosómica en células normales y cancerosas :
estudio en fase de crecimiento logarítmico y de síntesis de
DNA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Silvia del Pilar Aurora López Burillo

DIRECTOR:

Isidro Valladares Sánchez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE de MADRID.

FACULTAD DE CIENCIAS - SECCION DE QUIMICAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

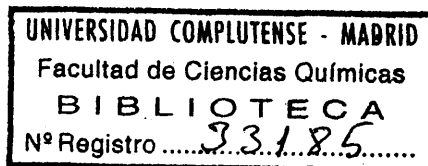


5324472370

TL
577 1
LOP

"ACTIVIDAD RIBOSOMICA EN CELULAS
NORMALES Y CANCEROSAS".

Estudio en fase de crecimiento -
logarítmico y de síntesis de DNA.



b16513344
L 36105077

Memoria para optar al Grado de Doctor
en Ciencias Químicas, que presenta
Silvia del Pilar Aurora López Burillo.

Madrid, 1976

Este trabajo fué realizado en el Dpto. de Biología y Bioquímica del Cáncer del Instituto Nacional de Oncología.

Deseo hacer constar mi agradecimiento al Ministerio de Educación y Ciencia y a la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer, cuyas sucesivas subvenciones hicieron posible esta realización.

Agradezco al Dr. F. Vallejo Nágera, Director Gerente de dicha Fundación, su apoyo y estímulo, así como al - Profesor A. Martín Municio, Jefe del Dpto. de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense, sus - orientaciones.

Especialmente deseo agradecer al Dr. Y. Valladares Sanchez, Jefe del Dpto. de Biología y Bioquímica del - Cáncer, la sugerencia del tema y su dirección.

Asimismo, expreso el más profundo agradecimiento hacia todos mis amigos y compañeros por su inestimable ayuda y colaboración a lo largo de estos años; a todas las personas que, de alguna manera, han contribuido a la realización de - este trabajo.

Madrid, Mayo, 1976

ABREVIATURAS más usadas en esta MEMORIA	VII
---	-----

Parte Primera

PLANTEAMIENTO TEORICO

I.- <u>INTRODUCCION</u>	1
I.1.- EL CANCER, NEOPLASIA IRREVERSIBLE y HEREDITARIA SOMATICAMENTE	3
I.2.- ASPECTOS MACROMOLECULARES. POLIRRIBOSOMAS ..	4
II.- <u>CONSIDERACIONES GENERALES que CONDICIONAN este ESTUDIO</u>	6
II.1.- BIOSINTESIS de PROTEINAS en CELULAS EUCARIOTICAS	6
II.1.1.- Estructura Polirribosomica	6
II.1.2.- Actuación polirribosómica en células eucarióticas	7
II.2.- EVOLUCION RIBOSOMICA a lo LARGO del CICLO CELULAR	8
II.2.1.- Mitosis y fase G_1	8
II.2.2.- Fase S	10
II.2.3.- Fase G_2	10

II.3.- POLIRRIBOSOMAS LIBRES y UNIDOS a MEMBRANAS ...	10
II.3.1.- Aspectos moleculares	12
II.3.2.- Función específica de los polisomas unidos a membranas	13
II.3.3.- Función de los polisomas libres	14
II.3.4.- Dependencia del medio exterior	14
 III.- <u>FACTORES EXTRACELULARES que AFECTAN a la ESTRUCTURA</u> <u>POLIRRIBOSOMICA</u>	16
 III.1.- FACTORES de ACCION INDIRECTA	17
III.1.1.- Cultivos celulares. Establecimiento "in vitro" y medios de crecimiento	17
III.1.1.1.- Temperatura de incubación	18
III.1.2.- Sincronización en fase S	19
 III.2.- FACTORES de ACCION DIRECTA: TECNICA de AISLA- MIENTO	23
III.2.1.- Lisis hipotónica	24
III.2.2.- Lisis con detergentes no iónicos	24
III.2.2.1.- Influencia de la concentración sa- lina y del pH	25
III.2.3.- Homogeneización	27
III.2.3.1.- Influencia de la concentración sa- lina y del pH	28
III.2.4.- Temperatura y acción de las RNasas	30
III.2.5.- Purificación del crudo citoplásmico	32
III.2.5.1.- Obtención de polisomas libres y unidos a membranas por separado..	32

CONDICIONES EXPERIMENTALES

IV.- <u>MATERIALES Y METODOS</u>	33
IV.1.- PRODUCTOS	34
IV.2.- MATERIAL BIOLOGICO de PARTIDA	34
IV.2.1.- Células normales	36
IV.2.2.- Células cancerosas	39
IV.2.3.- Establecimiento de la línea celular CAEL "in vitro"	48
IV.3.- CARACTERIZACION de las LINEAS CELULARES DESCRITAS. TECNICAS más IMPORTANTES	50
IV.3.1.- Control morfológico	51
IV.3.2.- Control cinético	52
IV.3.2.1.- Curva de crecimiento	52
IV.3.2.2.- Ciclo celular	53
IV.4.- SINCRONIZACION de CAEL "IN VITRO" en FASE de SINTESIS de DNA	59
IV.5.- AISLAMIENTO de POLISOMAS	61
IV.5.1.- Introducción	61
IV.5.2.- Directrices seguidas en los distintos aislamientos de polirribosomas	62
IV.5.3.- Marcado isotópico de polipéptidos nacientes ..	65

V.2.1.- Pella nuclear	114
V.2.2.- Pella mitocondrial	119
V.3.- DEGRADACION a través del TIEMPO de los POLISOMAS AISLADOS	124
VI.- <u>ACTIVIDAD POLISOMICA</u>	126
VI.1.- CELULAS NORMALES y CANCEROSAS "IN VITRO"	127
VI.1.1.- Polisomas totales y libres de ERGAN	128
VI.1.1.1.- Estudio de las bandas del gradiente discontinuo	135
VI.1.2.- Polisomas libres y unidos a membranas en células CAEL "in vitro"	136
VI.1.3.- Polisomas libres y unidos a membranas en células CAE "in vitro"	143
VI.1.4.- Análisis e interpretación de los resultados	151
VI.2.- CELULAS CANCEROSAS "IN VIVO" e "IN VITRO" ...	154
VI.2.1.- Polisomas totales y libres de células CAEL "in vivo"	154
VI.2.2.- Polisomas de CAEL "in vitro". Comparación con los resultados anteriores e interpretación	159
VI.2.3.- Polisomas de CAE "in vivo" e "in vitro"	161
VI.3.- FASE S del CICLO CELULAR	161
VI.3.1.- Polirribosomas durante la fase S del ciclo celular en células CAEL	162
VI.3.2.- Relaciones entre polisomas en tumor CAEL y en células CAEL en fase S	168

VII.- <u>CONCLUSIONES</u>	171
VII.1.- INFLUENCIA de las CONDICIONES del AISLAMIENTO	171
VII.2.- ACTIVIDAD POLISOMICA. CONJUNTO CELULAR y CELULAS en FASE S	173
VII.2.1.- Células normales y cancerosas. Crecimiento logarítmico y fase S	173
VII.2.2.- Células cancerosas "in vivo" e "in vitro" ...	175
BIBLIOGRAFIA	176

ABREVIATURAS más usadas en esta MEMORIA

Hela	Células tumorales cancerosas humanas (línea establecida)
BHK	Células de riñón de hamster joven (línea establecida)
ERGAN	Células de embrión de ratón establecidas "in vitro" en el Departamento de Biología y Bioquímica del Cancer del Instituto Nacional de Oncología.
CAE	Células cancerosas de tumor ascítico de Ehrlich. Cepa hemorrágica. (Mantenidas en el mismo Departamento)
CAEL	Células cancerosas de tumor ascítico de Ehrlich-Lettré. Cepa no hemorrágica (Mantenidas en el mismo Departamento).
R5a + st10	Medio semidefinido de crecimiento (tabla 2). Se suplementa con 10 % de suero de ternera. Se usa en los cultivos en monocapa (ERGAN)
B + st 20	Medio semidefinido de crecimiento (tabla 3). Se suplementa con 20 % de suero de ternera. Se usa en cultivos en suspensión (CAE y CAEL "in vitro").
GKN	Solución salina de lavado, compuesta de glucosa KCl y NaCl
PBS	Solución salina equilibrada. Se usa sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (tabla 5)
SSS-I	Solución salina base del medio B para cultivos en suspensión (tabla 3)
spm	Sobrenadante postmitocondrial; resultante de centrifugar el crudo, libre de núcleos, 10 minutos a $10.000 \times g$.

PLANTEAMIENTO TEORICO

I.- INTRODUCCION

Los polirribosomas, por sus especiales características, están íntimamente ligados a la actividad celular. El ser una estructura eminentemente funcional, regulada según las necesidades celulares, asiento de la síntesis de proteínas, hace que gran número de investigadores se hayan preocupado durante años de sus modificaciones en las diferentes circunstancias de la vida celular. Una de las alteraciones celulares, que atrae de forma especial la atención, es la oncológica en sus dos modalidades benigna y maligna. Los polisomas reflejan claramente, tanto en su distribución dentro de la célula, como en su morfología y actividad, este estado anómalo, participando estrechamente en el mismo, por lo que un estudio polisómico constituye un aspecto importante dentro de la amplia problemática oncológica.

Por otra parte, todo acercamiento a un biopolímero supone introducir cambios importantes en él, por lo que los resultados obtenidos están siempre en función de la técnica aplicada al estudio. Esto hace que, en parte, el cúmulo de datos ya conocidos sean difícilmente comparables e intercambiables.

En estas circunstancias se comenzó este trabajo, tratando de estudiar los polisomas de tejidos normales y cancerosos de forma "fisiológica", es decir, lo mas cerca posible de la realidad celular de dichos tejidos e intentando además conseguir que los datos obtenidos a partir de ámbos tipos celulares sean comparables.

Hemos querido analizar la actividad polisómica en el tejido canceroso considerado como conjunto de células, y la que se produce en la célula tumoral en particular. Para ello, se ha tomado primero el tumor en fase de crecimiento logarítmico, en la que las células constituyentes se encuentran en cualquier momento de su propio ciclo vital (ciclo celular), por lo que los resultados serán valores representativos del conjunto de la población celular, es decir, del tumor.

A continuación se toma una población en la que el 80% aproximadamente de las células se encuentran en una misma fase de su ciclo; concretamente elegimos la fase de síntesis de DNA (fase S), por ser la más sencilla en cuanto a síntesis de proteínas se refiere.

Este último estudio implica modificar el crecimiento libre del tumor para sincronizar su población celular. Las técnicas conocidas a tal efecto suelen ser más eficaces cuando se aplican a poblaciones adaptadas a crecimiento "in vitro", que cuando se hace directamente sobre el tumor "in vivo". Para conseguir resultados de interpretación más segura se eligió la sincronización del tumor previamente adaptado a crecimiento en medio semicondicionado y se estudió también como afecta a la actividad polisómica del conjunto celular esa adaptación a crecimiento "in vitro".

El material celular elegido para hacer el estudio ha sido tumor ascítico de Ehrlich (ver capítulo IV.2.- Material biológico de partida) y, como células normales, cultivo establecido de embrión de ratón (ERGAN).

Para alcanzar nuestro objetivo, se hizo primero un estudio de las técnicas más comúnmente usadas, modificándolas y adaptándolas a nuestras posibilidades y condiciones de trabajo; así como a las líneas celulares objeto de nuestro estudio, de forma que se pudiese seguir una misma sistemática con todas estas.

Uno de los puntos menos claros acerca de los polisomas de células de mamífero en general, y de tumor ascítico de Ehrlich en particular, es la significación - de su diferenciación en dos sistemas : polisomas libres en el citoplasma, y polisomas unidos a membranas de retículo endoplásmico. Por ello, en todo nuestro trabajo, se estudian por separado ambos sistemas en sus aspectos morfológicos y funcionales.

Las manipulaciones necesarias para conseguir una población en fase S (adaptación a crecimiento "in vitro" y sincronización) son otros tantos cambios introducidos en la célula, que afectan a la estructura polirribosómica, y que se estudian por separado.

En resumen, haremos un estudio lo más completo posible de todos los factores que se entremezclan en el camino que lleva al conocimiento de un biopolímero, partiendo de los morfológicos para profundizar luego en los bioquímicos.

1.1.- EL CANCER, NEOPLASIA IRREVERSIBLE y HEREDITARIA SOMATICA.

Desde el año 1894 en que L. Heidenhain sugiere que los tumores pueden ser producidos por anomalías cromosómicas, numerosos autores (56, 83 y 146) - describieron la presencia de éstas y la aparición de células tetraploides en tumores humanos, de animales, e, incluso, en tejidos vegetales (83). Esta - hipótesis no llegó a comprobarse experimentalmente, quedándose en la mera observación morfológica.

En 1947, P.C. Koller supuso que las alteraciones cromosómicas podrían ser la consecuencia de previas alteraciones citoplásmicas (75), ya que existían fenómenos nucleares regulados por el citoplasma.

Muchas hipótesis fueron apareciendo desde entonces, ya que los cromosomas eran el asiento de los factores hereditarios y su relación con diversas neoplasias despertaba gran interés.

Posteriormente, se pudo establecer y demostrar, en gran número de tumores, la influencia genética en la aparición y desarrollo del cáncer, pero no que las alteraciones cromosómicas fuesen su causa.

I. Berenblun y P. Shubik (1947, 1954) consideran que la cancerización se produce en dos etapas : una, fase de iniciación, que origina células tumorales - latentes, y otra, fase de promoción, necesaria para que estas células den lugar a una masa neoplásica (9, 10 y 11). Ambas fases son irreversibles, aunque la persistencia de la primera no basta para desencadenar una neoplasia, es - necesaria la segunda. En la fase inicial puede estar implicada una predisposición genética, una alteración citoplásmica por un agente cancerígeno, de tipo físico (radiaciones), químico (hidrocarburos cancerígenos), o biológico (virus, infecciones crónicas, etc.), o la acción "subcancerígena" de diversos agentes que aisladamente no producen cáncer. En la segunda fase se produce una modificación neoplásica hereditaria en el sentido de que se trasmite de generación en generación celular. Los agentes de promoción son múltiples: físicos, químicos, víricos y metabólicos. También puede estimular esta fase la simple - proliferación celular inespecífica (34).

Otro autor, L. Foulds (1954, 1958), considera que la progresión tumoral es paulatina, desarrollándose un proceso complejo en el que se combinan modificaciones independientes de caracteres unitarios que deciden la aparición de la célula cancerosa (44).

En ambas hipótesis, el condicionamiento genético constituye una pieza - clave para la transformación cancerosa, y por tanto, cualquier cambio en el DNA y en las nucleoproteínas del genoma puede ser esencial.

1.2.- ASPECTOS MACROMOLECULARES. POLIRRIBOSOMAS.

En el estudio de los procesos de transformación neoplásica, y más concretamente en los de malignización celular, es interesante distinguir los aspectos macromoleculares en ellos involucrados y su repercusión en el orden bioquímico, ya que son la causa de la fenomenología observada morfológicamente, es decir, averiguar a qué niveles actúan cada uno de los agentes cancerígenos, qué alteraciones moleculares producen realmente.

Es evidente que el DNA celular se transforma más o menos gradualmente, ya que cada cambio celular es transmitido de generación en generación.

Los estudios enzimáticos realizados en células transformadas (52, 95 y 139) detectan modificaciones, consecuencia lógica de lo anterior; por una parte, genes existentes en el DNA de las células normales pueden desaparecer o que dar inhibidos durante la transformación neoplásica por lo que se pierden algunos sistemas enzimáticos, y por otra, es posible también una alteración genética que repercuta en cambios estructurales (y por tanto bioquímicos) de las enzimas por ellos codificadas. Consecuencia de todo ello son los cambios metabólicos y morfológicos de la célula a los que antes hacíamos referencia. La interrelación núcleo-citoplasma hace pensar que estos fenómenos han sido producidos por otros previos y son, o pueden ser, desencadenantes de nuevos fenómenos que también afecten al DNA. Nos encontramos en un círculo vicioso. Una de las etapas en la que esa interrelación se expresa con más rapidez (estando más próximos causa y efecto) es la de traducción del m-RNA por los - ribosomas a proteínas. Las estructuras formadas a tal fin, los polirribosomas, intervienen directamente en la interregulación núcleo-citoplasma y la muestran claramente con su actividad.

La inhibición del crecimiento celular, que se produce en células normales al entrar en contacto unas con otras, lleva consigo una disgregación paulatina de los polisomas a monosomas. Este fenómeno no se repite en cultivos de células cancerosas. *

En algunos casos se ha demostrado que ciertas distribuciones de polirribosomas son características de diferentes estados de maduración vírica (25, 104 y 106). Lo mismo puede suceder en células de tumores no experimentales.

Los estudios ya realizados en esta línea han concluido que en células normales la distribución ribosómica más frecuente es la de polirribosomas de 5 a 7 ribosomas (17 y 25). En células transformadas víricamente se encuentran de - hasta 40 unidades (25), así como en células procedentes de tumores humanos, mantenidas "in vitro" (104).

También se ha observado que en las células de ciclo corto los ribosomas y polirribosomas se encuentran en su mayor parte libres en el citoplasma, así como en las células tumorales (15), en las tratadas con cancerígenos y en las infectadas víricamente (25 y 104).

Si a esto unimos : a) el ser una estructura funcional, es decir, sin existencia permanente en la célula, ya que se forma para sintetizar cada proteína determinada sólo cuando ésta es necesaria a la célula; b) el presentar una especificidad total, ya que cada polirribosoma sólo sintetiza una proteína concreta, la codificada por el m-RNA integrante; c) el cambiar su distribución en función del ciclo celular, y el ser relativamente manejable; nos encontramos frente a un elemento del que podemos obtener gran cantidad de información indirecta acerca de las alteraciones genéticas experimentadas por la célula al - malignizarse.

* Al añadir una preparación de membranas citoplásmicas a un cultivo preconfluente de células normales se observa la misma disgregación polisómica que en fase de confluencia. Las células cancerosas no se alteran (84).

II.- CONSIDERACIONES GENERALES que COND'CIONAN este ESTUDIO

El aspecto que más nos interesa resaltar de la estructura funcional que estamos manejando es precisamente éste, el de ser exclusivamente funcional. Buena prueba de ello es su evolución a lo largo del ciclo celular.

En las células cancerosas, en las que se da una elevada especificidad proteica, tanto enzimática como inmunológica, cabe esperar, y se encuentra de hecho, esta misma especificidad en cuanto a la distribución de estructuras y de actividades ribosómicas y polisómicas.

Vamos a repasar rápidamente algunos conocimientos básicos necesarios para - nuestro trabajo.

II.1.- BIOSINTESIS de PROTEINAS en CELULAS EUCARIOTICAS.

II.1.1.- Estructura Polirribosómica.

Los ribosomas hallados en organismos eucarióticos son ligeramente distintos a los de los procarióticos, que han sido ampliamente estudiados, (38, 77, 98 y 127). Los de células de mamífero son también partículas de ribonúcleo-proteína; contienen aproximadamente la misma cantidad de proteínas que de r-RNA; el peso molecular es de alrededor de 4×10^6 daltons, tienen 250 Å de diámetro, y su coeficiente de sedimentación en su forma más compacta es de 80 S aproximadamente.

Las dos subunidades desiguales que los componen presentan unos coeficientes de sedimentación de 60 y 40 S más o menos. Las subunidades 40 S contienen r-RNA de 18 S solamente, y las 60 S de 28 S principalmente con pequeñas cantidades de r-RNA de 5 S.

Los polirribosomas de células eucarióticas están formados por los mismos elementos que los hallados en procarióticas : m-RNA, ribosomas y proteínas.

El m-RNA no está presente como una cadena desnuda, sino como un complejo RNA-proteínas. Estas mismas proteínas se han encontrado unidas al RNA homólogo del RNA semejante al DNA que se encuentra en el núcleo celular, y

es posible que cumplan una misión protectora de la cadena ribonucleica (30, 57 y 107). Más adelante veremos esta asociación a proteínas.

II.1.2.- Actuación polirribosómica en células eucarióticas.

Su significado como estructura biosintetizadora de proteínas fué establecido en reticulocitos de conejo (142), y posteriormente se continuó su estudio en hígado de rata (128) y en ganglios linfáticos. En músculo embrionario de pollo, se han encontrado polisomas de 60 unidades ribosómicas sintetizadores de la miosina, de acuerdo con el m-RNA de 5.500 nucleótidos necesarios - para codificar la subunidad proteica de 200.000 daltons.

El proceso de biosíntesis de proteínas en células eucarióticas ha sido estudiado paralelamente al seguido por células procarióticas (68). Por ser un tema - sobradamente conocido sólo vamos a apuntar las diferencias más importantes existentes entre los dos sistemas.

1) Iniciación de la síntesis proteica :

No se ha detectado transformilasa en los extractos de células eucarióticas, aunque la metionina sigue siendo en este caso el aminoácido iniciador (24). Los resultados experimentales sugieren la existencia de factores específicos de cada célula implicados en la iniciación estimulando la unión del mensajero a los ribosomas (58 y 59). Así, en células eucarióticas no se requiere la formación del met-t-RNA_f para la iniciación de la traducción (120).

Por otra parte, de células cancerosas se han aislado dos factores que regulan la iniciación (49).

2) Elongación de la cadena peptídica :

Se han aislado a partir de células eucarióticas dos factores de elongación, - uno equivalente al factor EFT, y otro al factor EFG, con propiedades muy parecidas a las de los procarióticos (120).

3) Terminación de la cadena polipéptida :

En eucarióticos parece ser similar a la que se produce en procarióticos. El triplete UAA actúa como codón sin sentido, dando lugar al desprendimiento de la cadena de citocromo-c en levadura de panadería (131). Por otra parte se ha aislado un factor de terminación en reticulocitos (50).

Experimentalmente se han hallado un par de excepciones en cuanto al proceso de biosíntesis :

a) En reticulocitos de conejo, se han encontrado ribosomas unidos a m-RNA (un solo ribosoma en cada cadena de mensajero), capaces de sintetizar cadenas polipeptídicas completamente nuevas en sistemas libres de células (80). También se han hallado en hígado de rata (93).

b) En algunas condiciones metabólicas un m-RNA puede encontrarse asociado con polisomas mucho más largos o pesados de lo que correspondería. Esto se observó en reticulocitos de conejo incubados en presencia de metiltreonina * (17).

II.2.- EVOLUCION RIBOSOMICA a lo LARGO del CICLO CELULAR.

Son múltiples los estudios realizados sobre la biosíntesis de proteínas en cada fase del ciclo celular** (121, 125, 129 y 130). En concordancia con las diferentes proteínas sintetizadas se producen variaciones en el agrupamiento ribosómico. Estos estudios se realizan necesariamente en células sincronizadas, lo que implica una alteración celular y la posible introducción de artefactos experimentales, como veremos en el apartado correspondiente. De los resultados obtenidos se puede deducir que una serie de proteínas son sintetizadas exclusivamente en alguna de las fases del ciclo y no en todas (1).

II.2.1.- Mitosis y fase G₁.

Análisis autorradiográficos indican que durante la mitosis no hay síntesis de DNA, cesa la de RNA y disminuye rápidamente la de proteínas (130).

* La metiltreonina actúa como antagonista de la isoleucina.

** Ciclo celular según Howard y Pelc (65 y 66).

Durante la metafase los polirribosomas se disocian (121 y 125), quedando muy pocos en la región de 150 a 300 S *, y más en la 80 S en comparación con lo observado en las células en interfase. Asociada a la disminución de polirribosomas hay una importante disminución de síntesis de proteínas.

Experimentos realizados con células sincronizadas en metafase por diferentes métodos, conducen al mismo resultado (125).

En las siguientes 2 horas del ciclo (fase G_1) se observa un aumento gradual en el tamaño y cantidad de los polirribosomas y disminución de los ribosomas 80 S. La síntesis de proteínas aumenta proporcionalmente al número de polisomas (130). En fase G_1 la distribución de polirribosomas es parecida a la de una población no sincronizada; está relacionada durante cierto tiempo con la formación de la membrana nuclear. Recientemente se ha visto como posible - el que también la síntesis de proteínas de secreción esté primeramente restringida a esta fase (1).

Por otra parte, en células cancerosas se han obtenido los mismos resultados, así en HeLa ** comprobaron por observación al microscópio electrónico que:

- en la metafase los ribosomas están homogéneamente repartidos por el citoplasma.
- en la interfase los ribosomas están acumulados en hélices y en agregados amorfos.

Igualmente en tumor plasmático de ratón se ha observado un aumento en G_1 de polisomas unidos a membranas, alcanzando el valor más alto del ciclo, 28%, de acuerdo con la actividad secretora de esta fase (1).

La disociación de polisomas durante la mitosis puede ser debida a la falta de síntesis de RNA aunque si fuese este el motivo, aquella no sería tan rápida, ya que el m-RNA de células HeLa tiene una vida media aproximadamente de 3 ó 4 horas, y la metafase dura sólo 15 minutos. Tampoco se ha detectado un

* Polisomas de 3 ó 4 ribosomas en adelante.

** Células tumorales humanas.

aumento de la actividad ribonucleásica en esa fase que explique una destrucción repentina del m-RNA.

Experimentos realizados en esta línea usando inhibidores de la síntesis de RNA, demuestran que el montaje de los polirribosomas después de la mitosis ocurre independientemente de la síntesis "de novo" del RNA (130). Esto sugiere que el mensajero pasa de la primera célula a las de la segunda generación, y es usado para dirigir la síntesis de proteínas durante, al menos, los estados iniciados del siguiente ciclo celular.

II.2.2.- Fase S.

En esta fase se sintetiza el DNA celular en un proceso coordinado, dividido en dos períodos : en el primero se replica el DNA extranucleolar, y en el segundo el nucleolar (137). Solo se sintetiza una pequeña cantidad de m-RNA de vida media corta.

Nosotros estudiaremos la actividad polirribosómica en células cancerosas durante la fase temprana de síntesis de DNA.

En general, se observa en fase S una disminución de polisomas, aunque se sigue produciendo síntesis de proteínas necesarias para iniciar la de DNA y m-RNA, además de la de histonas que sólo se produce en esta fase (76, 84 y 129).

En algunos tejidos tumorales se ha observado un cierto número de polisomas ligados a membranas, menor que el existente en G_1 (1).

II.2.3.- Fase G_2 .

En fase G_2 se produce una gran parte de RNA, sobre todo r-RNA, y la actividad ribosómica es muy elevada; los polirribosomas presentan una distribución similar a la aparecida en G_1 , aunque su número es mayor.

II.3.- POLIRRIBOSOMAS LIBRES y UNIDOS a MEMBRANAS.

Actualmente son sobradamente conocidas las dos formas de presentarse los polisomas citoplásmicos en células de mamífero :

1) Unidos a membranas del retículo endoplásmico* .

2) Libres sin relación con ningún otro componente subcelular.

La aparición de estos dos tipos de partículas fué descrita por primera vez por Palade (103).

Desde 1963 en que Wettstein (144) aisló por primera vez polirribosomas a - partir de hígado de rata por tratamiento con DOC ** del sobrenadante post-mitocondrial, gran número de investigadores siguieron esa técnica. Más tarde Bloemendal (14) publica un trabajo en el que demuestra que se pueden aislar por separado ambos tipos de polisomas con buen rendimiento a partir de hígado de rata sin utilizar detergentes, y que también es aplicable a otros tejidos como riñón, hipófisis, y un gran número de tumores.

Este método fué decisivo para comprender mejor las características "in situ" de los polisomas unidos a membranas (ya que con él no se desprenden de éstas), y también la posible disociación "in vivo" del complejo membrana-polisoma*** .

En tejidos embrionarios, y en general en células de crecimiento rápido, la mayor parte de los polisomas estaban libres y relacionados probablemente con la síntesis de proteínas de uso interno. Por otra parte, en células diferenciadas donde se producen grandes cantidades de proteínas que se transportan, las partículas se encuentran, en su mayor parte, estrechamente asociadas al retículo endoplásmico.

* Morfológicamente estas membranas presentan un aspecto "rugoso", por lo que antes de conocer su verdadera constitución se denominó retículo endoplásmico rugoso a todo el conjunto.

** DOC = Desoxicolato sódico.

*** En 1965 Campbell (29) hace evidente la existencia de polisomas libres en la fracción microsómica y sugiere que estos polisomas derivan de los unidos a membranas. Más tarde en 1966 (28) comprueba que - ambos sistemas tienen existencia real e independiente en la célula.

II.3.1.- Aspectos moleculares.

Estudiados macromolecularmente ambos tipos de polisomas no presentan grandes diferencias. Los análisis del RNA ribosómico de cada sistema no revelan ninguna diferencia significativa. No hay tampoco diferencias marcadas en cuanto al tamaño de los polisomas integrantes (27).

Respecto a la naturaleza de la unión de los polisomas a las membranas se tienen algunos datos, pero no está claro. Los tratamientos con detergentes iónicos* (DOC, SDS), o no iónicos* (Tritón X-100, Lubrol W), conducen a la liberación de partículas ribosómicas sedimentables; según los casos se obtienen sólo monosomas, o monosomas y dímeros (17 y 25), aunque cuando las condiciones de protección polisómica se mantienen rigurosamente, se obtienen polisomas (17).

Ultimamente (2, 117, 122 y 124), los resultados parecen sugerir que hay dos tipos de uniones entre los polirribosomas y las membranas. Uno es sensible a la alta concentración salina, y otro a la puomicina, siendo además posible, al parecer, incluir el polipéptido naciente como componente de la unión.

Es muy probable que en tejidos no secretores el enlace más importante es el sensible a la concentración salina.

En algunos tejidos cancerosos como tumores ascíticos de Krebs y de Ehrlich, es posible que la unión se produzca primero por interacción de la membrana con algunos sectores del m-RNA directamente, antes de que los ribosomas se unan para formar el complejo traductor (35, 41 y 43), mientras que en HeLa (118) parece haber dos uniones, una debida a la subunidad 60 S (sensible al EDTA), y otra sensible a la RNasa, que podría ser la interacción m-RNA-membrana.

Por otra parte es posible que estén involucradas en el enlace las proteínas ribosómicas así como las de membrana.

* Solubilizan las membranas y en general las estructuras lipídicas.

II.3.2.- Función específica de los polisomas unidos a membranas.

Desde el descubrimiento de la existencia de ambos tipos de polisomas se busca explicación al por qué de esta duplicación de sistemas para sintetizar proteínas.

En hígado de rata se ha visto que los polisomas libres incorporan leucina $[^{14}\text{C}]$ "in vivo" en los 5 primeros minutos, y luego decrece la incorporación, mientras que los unidos a membranas presentan el máximo de incorporación a los 60 minutos.

Campbell y otros autores (27, 51, 61, 108 y 123) consideran posible que los polisomas unidos a membranas sinteticen proteínas de secreción interna y externa celular. Así se ha encontrado (108 y 123) que la seroalbúmina sintetizada "in vivo" por células de hígado aparece en el interior de las bolsas formadas por las membranas reticulares. Peters (61) ha demostrado que una proteína, tal como la catalasa (que se encuentra en los lisosomas), es sintetizada por los polisomas ligados a membranas. *

Quizá los estudios más interesantes sobre este punto sean los realizados en glándulas mamarias del conejillo de Indias sobre síntesis de lactosa (20-23, 33 y 47), y alrededor de la biosíntesis de inmunoglobulinas (6 y 145).

En células de corteza cerebral de rata es posible que los polisomas del retículo rugoso sinteticen proteínas locales (4), y se ha sugerido que la función de estos polisomas en tejidos no secretores es la de sintetizar las proteínas de las membranas (37).

En general la secreción de proteínas, así como la formación de enzimas, se ve favorecida al producirse la síntesis atravesando la membrana reticular y

* Más recientemente se ha estudiado el lugar de síntesis de las proteínas solubles de las mitocondrias, y parece probable que el citocromo-c (representativo de estas proteínas) sea sintetizado por los polirribosomas ligados a membranas (51).

quedar las proteínas en el interior de las bolsas reticulares.

Pero debe existir otra función para esta interacción ya que: a) se observa síntesis de proteínas por polisomas unidos a membranas en células no secretoras; y b) en tejidos secretores y no secretores en crecimiento experimentalmente acelerado, se produce un aumento masivo de los polisomas unidos a membranas, sin sintetizándose principalmente proteínas intracelulares.

Tata (134) propone como función principal de la interacción membrana-ribosoma la de efectuar una separación topológica de diferentes poblaciones ribosómicas que sintetizan distintas clases de proteínas.

Comparando las células secretoras con las no secretoras, se observa que no hay diferencia entre sus perfiles de polisomas libres y el comportamiento de los mis mos. Sin embargo los unidos a membranas presentan diferentes conductas; en las células no secretoras el polipéptido naciente se vierte directamente al citoplasma sin pasar por el interior del retículo (134)

II.3.3.- Función de los polisomas libres.

Por todo lo visto anteriormente, parece claro que la unión de polisomas a membranas durante la síntesis de proteínas, tiene numerosas ventajas para la fisiología celular. Pero por otra parte, no todas las células presentan igual distribución de sus polisomas en libres y unidos a membranas; en células cancerosas el retículo endoplásmico rugoso disminuye y son más abundantes los polisomas li bres (143). En células de ciclo corto se observa el mismo hecho (105), así co mo en células tratadas con carcinógenos químicos. Estos factores hacen surgir interrogantes sobre el comportamiento de los polisomas libres:

En células de retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado ¿los polisomas libres sintetizan las mismas proteínas que los del retículo, u otras diferentes?

¿Qué sucede en células cancerosas sobre este tema?

Para resolver estas preguntas se tropieza con bastantes problemas, sobre todo en lo referente a la purificación de las proteínas sintetizadas por cada sistema. Algunos autores han encontrado (en hígado de rata) indicios de que los polisomas libres sintetizan ferritina (60 y 114).

II.3.4.- Dependencia del medio exterior

La existencia de polisomas libres en el caso de cultivos "in vitro" es algo que depende en alguna medida del medio de cultivo, es decir, de la nutrición celular. Así, se ha visto que en el sobrenadante postmitocondrial de células tumorales cultivadas en medio normal, la mayor parte de los polisomas son libres, pero si se cultivan en un medio enriquecido, éstos desaparecen.

Y en sentido opuesto, a partir de células incubadas durante 1 hora en solución salina, solo se obtienen ribosomas monoméricos; no hay polisomas.

A partir de células ascíticas de Ehrlich cultivadas en medio enriquecido, se ha aislado un complejo polisoma-membrana diferente del que integra el retículo endoplásmico rugoso (43). Este complejo no se obtiene si las células han sido incubadas en ausencia de aminoácidos; su presencia depende de las condiciones de incubación y no de las de rotura o lisis. Soporta abundantes lavados con buffer pobre en $MgCl_2$ sin que se desprendan ribosomas ni polisomas; éstos últimos sólo lo hacen por tratamiento con DOC (lo cual indica que están unidos a la membrana). Los tratamientos con EDTA y RNasa dan lugar a que se desprendan subunidades y ribosomas (43).

No se sabe cómo se unen los polisomas a las membranas en este complejo, ya que al microscopio electrónico se ve que los ribosomas no están en contacto directo con ellas (a diferencia del retículo endoplásmico rugoso). Su respuesta al EDTA y a la RNasa sugiere que la unión se realiza en virtud del enlace --m-RNA-ribosoma, lo cual confirmaría que el m-RNA se une a las membranas (35 y 42) en estas células.

El complejo contiene casi doble número de ribosomas que el retículo rugoso de hígado de rata. Su actividad bioquímica es la de síntesis de proteínas y en este caso sólo existe dicho complejo con esa función, ya que no hay polisomas libres, es decir, sintetiza la totalidad proteínica celular.

Este nuevo componente celular hace surgir importantes dudas acerca de la organización de la maquinaria de síntesis de proteínas y del papel fisiológico de los polisomas unidos a membranas. Ninguno de los papeles atribuidos hasta ahora a los polisomas de retículo endoplásmico se pueden aplicar a los del complejo de células ascíticas en esas condiciones experimentales, en las cuales constituye la totalidad del sistema sintetizador.

III.- FACTORES EXTRACELULARES que AFECTAN a la ESTRUCTURA POLIRIBOSOMICA.

Cualquier tipo de estudio que queramos realizar de un biopolímero, tanto "in situ" como aislado, nos plantea el problema de las modificaciones producidas en el mismo por los agentes introducidos a tal efecto. Estas variaciones nos darán una impresión deformada de la realidad, que lógicamente nos conducirá a interpretaciones poco exactas.

En general los polirribosomas reflejan rápidamente cualquier alteración sufrida por la célula. Nuestro deseo al realizar este trabajo fué en todo momento conseguir la estructura en estado nativo; es decir, no afectada con ningún tipo de manipulación innecesaria, o muy alejada de la fisiología normal celular.

Sin embargo, hubo que introducir unas cuantas modificaciones necesarias para el estudio, como el establecimiento "in vitro" de las células, el medio de cultivo de las mismas, el proceso de sincronización, y las técnicas de aislamiento con su gran cantidad de factores distorsionantes.

Vamos a ver la repercusión de cada uno de estos factores clasificándolos en dos tipos, según su modo de incidencia sobre los polirribosomas :

1) De acción indirecta: son los que alteran el metabolismo celular y a través de éste producen un cambio en la distribución ribosómica.

Consideraremos concretamente dos de ellos:

- a) Mantenimiento "in vitro"
- b) Sincronización

2) De acción directa: son los que inciden directamente sobre la propia estructura polisómica, independientemente del resto celular. Los más importantes son todos los relacionados con la técnica de aislamiento del biopolímero.

III.1.- FACTORES de ACCION INDIRECTA.

III.1.1.- Cultivos celulares. Establecimiento "in vitro" y medios de crecimiento.

Una de las características de las células somáticas mientras forman parte del ser vivo, es su constancia cromosómica. Cuando la célula se maligniza haciéndose cancerosa, pierde esta característica. Ahora bien, cuando se separan las células normales de su organismo y se cultivan "in vitro" en un medio nutritivo, se producen alteraciones cromosómicas ya desde el primer cultivo (cultivo primario). Durante los cultivos sucesivos, se va produciendo una selección natural de las células más capaces de adaptarse a ese medio, y, por tanto, van aumentando las alteraciones cromosómicas.

Son muy numerosos los estudios realizados sobre este fenómeno (32, 82 y 136), pero es interesante recordarlo ya que el cambio manifestado cromosómicamente tiene su paralelo en la estructura polirribosómica.

En células normales "in vitro" las alteraciones cromosómicas se producen más o menos de prisa, pero a la larga todas las líneas celulares establecidas se malignizan, por lo que hay que mantener un control biológico que indique si todavía son "normales" o ya son "cancerosas" *.

Una vez adaptadas al cultivo se ha visto que la proporción de polisomas (tanto en células normales como en cancerosas) está en función del medio. En general, medios ricos en aminoácidos hacen aumentar la cantidad relativa de polisomas y disminuir la de monosomas (53, 63, 71 y 140).

Por el contrario, si las células se incuban durante 30 minutos en solución salina simple o suplementada sólo con suero, la cantidad relativa de ribosomas aumenta por disociación de los polirribosomas (63, 78 y 81).

Estos mismos fenómenos se producen "in vivo" cuando es posible hacer llegar a las células una concentración relativamente elevada de aminoácidos.

* Este control se realiza por inoculación de células de cultivo a animales. Si son malignas dan lugar a tumores.

El aumento de la cantidad de polisomas con la concentración de aminoácidos dura varias horas, y no puede ser debido a una síntesis de "novo" de m-RNA, ya que la respuesta es rápida y se produce incluso en presencia de inhibidores de la síntesis de RNA como la actinomicina D.

Es posible :

- 1) que los aminoácidos aceleren el transporte de un RNA nuclear preexistente hacia el citoplasma,
- 2) que se aumente la velocidad del proceso de iniciación de formación de la cadena polirribosómica, o bien
- 3) que disminuya la velocidad de terminación de la cadena polipeptídica.

Parece mas probable que los aminoácidos estimulen el proceso de iniciación (63 y 140).

Por otra parte, ya hemos visto el efecto que produce un enriquecimiento del medio en las células ascíticas sobre los polisomas libres y unidos a membranas.

Otros hechos indican que los nutrientes modulan el valor de la síntesis a través de mecanismos que operan a nivel de traslación. La iniciación y la elongación de la cadena probablemente están influidas de forma independiente (140).

III.1.1.1.- Temperatura de incubación.

Otro factor importante es la temperatura de incubación del cultivo. 40 minutos a 42° C son suficientes para que la mayor parte de los polisomas se degraden a monosomas (147).

A esa temperatura las RNasas son muy activas y es probable que se liberen por rotura de lisosomas.

Si se mantiene más tiempo, mueren las células del cultivo.

III.1.2.- Sincronización en fase S.

Son múltiples los métodos descritos en la bibliografía para sincronizar poblaciones celulares en una determinada fase del ciclo celular (45, 88, 97, 116, 132, 135 y 137), tanto "in vivo" para tejidos no diferenciados o en crecimiento, como "in vitro" para tejidos y líneas celulares. En todos los casos se obtienen mejores rendimientos con la sincronización "in vitro". Por este motivo y por ser más controlable el proceso "in vitro", se eligió éste - para nuestro estudio de polisomas en fase S en células cancerosas de tumor ascítico de Ehrlich.

La técnica más elegante es quizá la de selección de las células en mitosis según describió Terasima (135), aunque presenta los inconvenientes de estar limitado a cultivos en monocapa y de rendir una pequeña cantidad de células. Otro método reciente, con el que se obtienen células en las diferentes fases sin alteraciones somáticas, es el de centrifugación en gradiente de Ficol (88), pero es mucho menos exacto y precisa un material especial.

Los métodos más efectivos para obtener una población numerosa en fase S son los de inducción de la misma por modificación del medio de nutrición, aunque alteran las propiedades del ciclo normal celular. En esta clase de técnicas las más escogidas son las de inhibición de la síntesis de DNA; pero deben ser analizadas cuidadosamente, ya que producen alteraciones metabólicas que podrían inducir a error en las interpretaciones de los aislamientos de polisomas hechos a partir de células así tratadas.

Ultimamente se ha comprobado que dos de los inhibidores de DNA más usados, la hidroxurea y el ara-C*, ejercen una acción secundaria de inhibición de la síntesis de proteínas a nivel de polisomas (36).

Nosotros hemos seleccionado para este trabajo el doble tratamiento con exceso de timidina (TdR).

* Citosina-arabinosa.

El primero en estudiar y aplicar este método fué Xeros (141). La sincronización obtenida con un solo tratamiento con TdR depende mucho de la concentración de nucleosido utilizada; por encima de 7,5 mM durante 20 a 32 horas es tóxica, y por debajo, el rendimiento es pequeño (45). Este inconveniente se soslaya dando dos choques de TdR 2 mM más cortos y separados el tiempo necesario para que las células inicien de nuevo el ciclo.

No se conoce exactamente el mecanismo por el cual un exceso de timidina inhibe la síntesis de DNA. Posiblemente la TdR exógena se absorbe dentro de las células, y se fosforila por la acción secuencial de tres pasos de la timidina kinasa hasta dar ácido desoxitimidintrifosfato (TTP) que se acumula. El TTP, a partir de cierto nivel, inhibe, por un proceso "feedback", la acción de la timidina kinasa, por lo que se detiene la fosforilación de la TdR; pero, si disminuye el nivel de TTP, vuelve a actuar la kinasa de forma que se mantiene una cantidad elevada de TTP. Y es éste el que inhibe a su vez la síntesis de precursores pirimidínicos del DNA en varias rutas. Se ha visto que el TTP exógeno inhibe de forma significativa la fosforilación del ácido desoxicitidindifosfato (dCDP), actuando también sobre la reducción de ácido citidindifosfato (CDP) a desoxicitidindifosfato (dCDP) (52). El efecto neto de estas inhibiciones es una deficiencia en dCTP (46 y 70) Esquema 1. Estos resultados conducen, primero a un lento descenso de la síntesis de DNA, y segundo (después de un tiempo igual a $T_{G_2} - T_M$) a una disminución de la proliferación de la población celular, que queda detenida el final de G_1 o al principio de S. Al quitar el exceso de TdR disminuye la cantidad intracelular de TTP, y se retira el bloqueo de la síntesis de dCTP, por lo que se obtiene de nuevo un valor normal dentro de la síntesis de DNA.

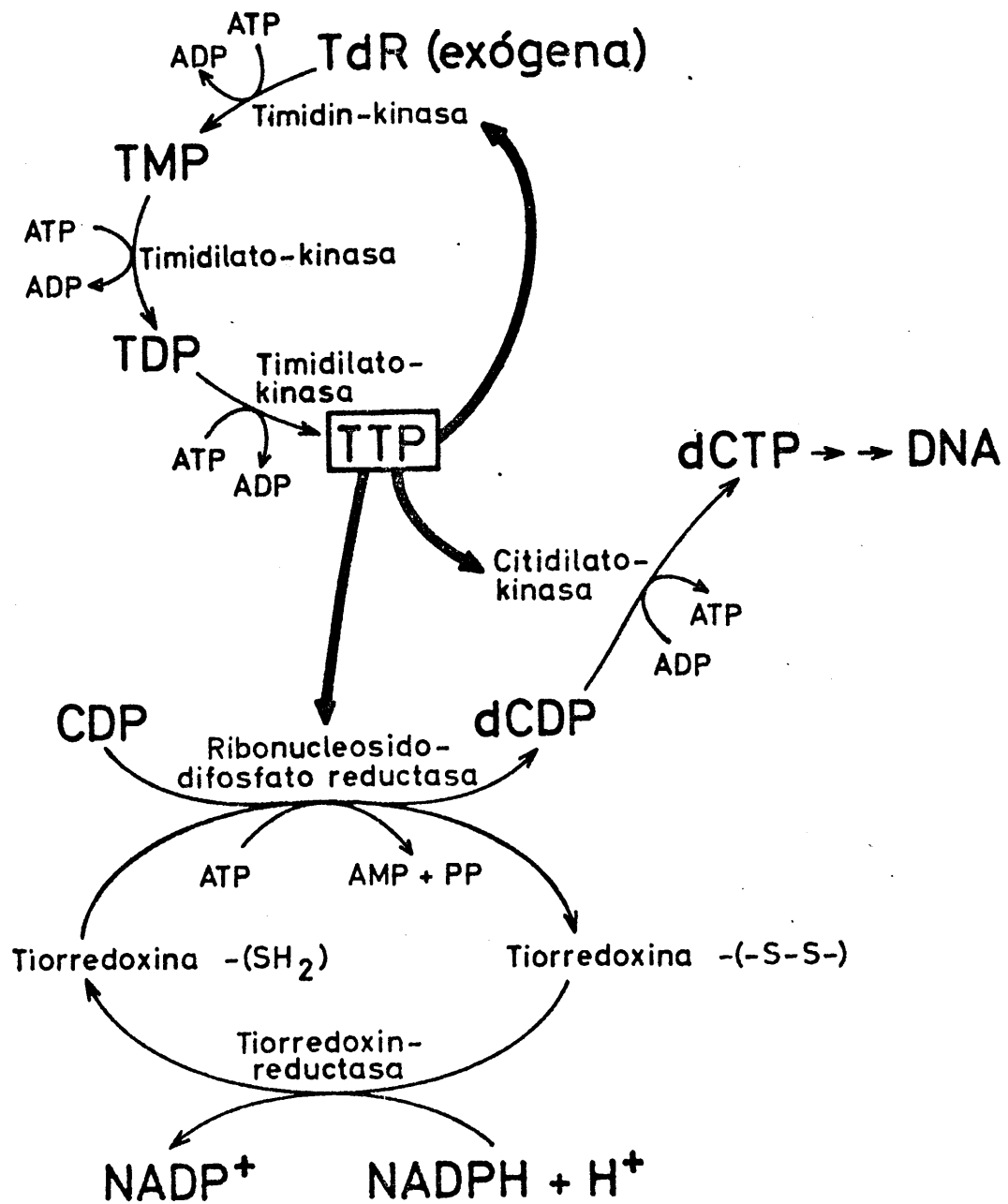
Es probable que la inhibición "feedback" ejercida por el TTP juegue un papel importante en el mecanismo nativo de regulación de DNA. Por tanto se puede suponer que este método de bloqueo y desbloqueo del DNA se aleja del fisiológico solo en términos de concentraciones, pero no de mecanismos bioquímicos (46). De momento no se conocen efectos secundarios de la TdR (36),

excepto un bloqueo parcial de la síntesis de RNA, por inhibición del paso de ácido uridindifosfato (UDP) a desoxiuridindifosfato (dUDP) (52) efectuada por el TTP en exceso. Tanto la TdR como la AdR o sus respectivos fosfatos, son capaces de inhibir la aspartato transcarbamilasa y la dihidroorotasa (19); ambas enzimas están implicadas en la síntesis "de novo" del RNA y del DNA. Kasten (69) hace un estudio autorradiográfico de la síntesis de ácidos nucleicos, y comprueba que durante el bloqueo producido por exceso de TdR se inhibe el marcado isotópico del RNA nucleolar y citoplásmico.

Esta técnica ha sido muy experimentada en células normales (18, 70 y 137), en las que el tratamiento con exceso de TdR no impide una proliferación celular ilimitada una vez eliminado el producto. Así, se clonifica un número normal de células. Sin embargo, sí se observa en las células tratadas (18) una disminución del tiempo de generación del primer ciclo celular respecto del control, fundamentalmente debido a un acortamiento de $T_S + T_{G_2}$. Es difícil determinar las causas exactas de este efecto, ya que en el segundo ciclo después de la sincronización, ésta se va perdiendo.

En células tumorales humanas se ha observado ese mismo acortamiento (76). En general, el proceso seguido por las células malignas o malignizadas es el mismo de las normales (137 y 138).

Sin embargo, en tumor ascítico de Ehrlich es posible que se produzca alguna diferencia. Utilizando una concentración de 2 mM en TdR Klenow no observó ni acúmulo de TTP en el citoplasma celular ni inhibición de la síntesis de DNA (74). Parece que estas células destruyen rápidamente la TdR. Trabajos posteriores condujeron al conocimiento de que en tejidos tumorales la timidina kinasa y la timidilato kinasa son mucho más activas que en las normales (52), y que el TTP exógeno inhibe de forma significativa la fosforilación de la TdR en todos los tumores tanto o más que en los correspondientes extractos de tejidos normales. Es decir, el mecanismo de control "feedback" de la síntesis de TTP es operativo en tejidos neoplásicos.



ESQUEMA 1 : Inhibición enzimática realizada por el TTP.

III.2.- FACTORES de ACCION DIRECTA : TECNICA de AISLAMIENTO.

No es necesario insistir en la casi imposibilidad actual de aislar una macromolécula biológica con su configuración nativa; el mero hecho de separarla del ambiente molecular del interior celular y colocarla en condiciones en las que las interacciones establecidas con el entorno son otras, basta para afectar de alguna manera a su estructura.

Concretamente, el aislamiento de un polirribosoma presenta la dificultad de obtenerlo con una estructura, tanto primaria como tridimensional, lo más - cerca posible a la que tiene en el interior de la célula.

Otro aspecto es el de la actividad biológica o bioquímica de esa molécula. Es posible aislar biomoléculas conservando total o parcialmente su actividad, siempre que no precisen de unas interacciones concretas con asociaciones - moleculares para mantener esencialmente su estructura y por tanto su funcionamiento.

En el caso de los polirribosomas, la actividad bioquímica implica unos cambios estructurales de gran importancia. Es decir, se produce una - íntima interrelación entre ambos aspectos, por lo que la conservación íntegra de la macromolécula se hace indispensable para obtener una información exacta sobre cualquiera de las dos. El aislamiento está en conflicto con esta conservación de la integridad molecular, no sólo por separar a la molécula de su medio ambiente natural, sino más especialmente, porque las operaciones en él implicadas pueden originar una - destrucción total o parcial de la macromolécula.

En este apartado vamos a ver cómo influyen en los polisomas algunas de estas manipulaciones, y discutiremos las causas que nos han llevado a elegir una metodología experimental.

En general, los factores que más hay que cuidar durante el aislamiento son:

- 1) Condiciones de lisis y fraccionamiento adecuados.
- 2) Manipulación rápida.
- 3) Temperatura baja.

El más amplio y el que vamos a estudiar a continuación es el primero.

Las condiciones de lisis más utilizadas son las de :

- 1) Lisis hipotónica.
- 2) Detergentes no iónicos.
- 3) Homogeneización suave.

III.2.1.- Lisis hipotónica.

La rotura de la membrana celular por choque osmótico simplemente no se puede aplicar a células como las de embrión de ratón o tumor ascítico de Ehrlich, que presentan una membrana bastante resistente; se romperían antes los lisosomas destruyendo las estructuras citoplásmicas. Hay que utilizar la segunda o la tercera de las técnicas indicadas. Vamos a verlas con algún detenimiento.

III.2.2.- Lisis con detergentes no iónicos.

Los detergentes no iónicos han sido y son muy utilizados para solubilizar las membranas citoplásmicas de diversos tipos celulares (17, 43, 62, 63, 96, 99 y 147).

Son algo menos enérgicos que los iónicos, pero presentan interesantes ventajas sobre éstos, como la de no alterar las uniones de ciertas proteínas normalmente asociadas al m-RNA o a las subunidades ribosómicas pequeñas (101) en los polisomas, por lo que éstos son más activos (un 50%) "in vitro" que

los preparados con detergentes iónicos (99); no destruyen pequeñas partículas ribonúcleoproteicas (probablemente subunidades 40 S) (64) etc.

La acción conjunta de ambos tipos de detergentes es altamente eficaz y no presenta los inconvenientes del uso de iónicos solamente.

Pero el uso de detergentes no iónicos en la lisis hace indistinguibles desde el primer momento los polisomas libres y los unidos a membranas, ya que solubilizan todas las membranas excepto la nuclear. Es preferible añadirlos al sobrenadante postmitocondrial, una vez retirados los polisomas libres.

III.2.2.1.- Influencia de la concentración salina y del pH.

La fuerza iónica del medio facilita la rotura de las membranas celulares por los detergentes no iónicos, y por tanto aumenta la cantidad de polisomas obtenidos a partir de cualquier tipo de tejido o cultivo.

Los mejores rendimientos se obtienen con fuerza iónica alta (0,3 M en KCl, y 0,01 M en $MgAc_2$) sin que influya la concentración de detergente (Triton X-100 de 0,05 a 0,8%), ni el pH entre 7,0 y 8,5 (48).

Cuando la lisis celular se realiza en medio hipotónico (0,01 M en KCl y 0,0015 en $MgAc_2$) con ayuda de Triton X-100, hay peligro, sobre todo en tejidos ricos en retículo, de que el material proteico se absorba a los polirribosomas y queden éstos atrapados en la pella al separar los por centrifugación (100).

Aumentando ligeramente la fuerza iónica a 0,03 M en KCl y 0,003 M en $MgAc_2$ y con la máxima concentración de detergente (0,8%), el rendimiento de polisomas sigue siendo bajo. En estas condiciones, afectan positivamente los valores crecientes de pH, pero aún así el rendimiento en medio hipotónico de pH 8,5 es mucho menor que el obtenido en medio hipertónico.

También se alteran los valores relativos de polisomas de cada peso molecular determinado por el gradiente de sacarosa, frente a los obtenidos en -

T A B L A 1 (Tomada de R. Ascione (5))						
Condiciones de lisis		Rendimiento * ribosómico	Análisis del gradiente de sacarosa			
Relación Cat. 1+ / Cat. 2+ (mM)	Detergente no iónico (%)	mg/10 ⁹ células BHK **	Subunidades a dímeros (%)	De dímeros a pentámeros (%)	De pentámeros en adelante. (%)	
10 : 1	--	1,55	65	22	13	
10 : 1	0,5	4,05	72	18	9	
150 : 15	--	2,35	24	34	41	
150 : 15	0,5	10,00	25	30	45	
150 : 15	1,0	12,00	27	26	47	
500 : 50	--	6,10	33	18	49	
500 : 50	0,5	11,05	36	9	55	

* 1 mg/ml ribosomas = 11,8 u.o. de A₂₆₀ nm.

** Células de riñón de hamster muy joven.

fuerza iónica alta, aumentando el número de los más pesados (de 5 ribosomas o más) con la concentración salina (Tabla 1).

Los polisomas perdidos se recuperan a partir de la pella procedente de eliminar los núcleos, simplemente por tratamiento de la misma con solución salina de fuerza iónica alta (0,3 M en KCl...) (48).

Es decir, la fuerza iónica y el pH a los que se realice la lisis celular con detergente no iónico, influyen sobre el perfil polisómico obtenido produciendo una cierta selección de polisomas según sus pesos moleculares.

Para nuestro estudio era necesario ensayar los efectos de una fuerza iónica media (0,15 M en KCl y 0,005 M en $MgCl_2$). Necesitábamos saber qué concentración de Triton X-100 era necesario emplear para separar o no separar los polisomas de las membranas en un medio isotónico, "fisiológico".

A este interrogante se le da respuesta en esta Memoria a través de varios ensayos con dos buffers de diferente fuerza iónica y una cinética de lisis.

III.2.3. - Homogeneización.

Los métodos de rotura celular por homogeneización deben ser considerados cuidadosamente. Morfológicamente, el polirribosoma es una estructura bastante lábil y sensible a la fragmentación mecánica; por lo tanto, se deben evitar al máximo las fuerzas de cizalla y usar una homogeneización suave.

En este campo sólo la experiencia directa puede dar la pauta, ya que cada tejido y cada línea celular presenta unas características propias en cuanto a la resistencia de su membrana citoplásmica.

Los resultados obtenidos dependen también en gran medida de la fuerza iónica del medio en el que se realiza el aislamiento.

Queremos hacer hincapié en que el sobrenadante postmitocondrial, obtenido después de la homogeneización suave, contiene tanto los polisomas libres como los unidos a membranas de la célula en su estado natural, de forma que son perfectamente distinguibles por sus muy diferentes pesos moleculares. Esto permite separarlos por centrifugación a través de un gradiente discontinuo de densidad de sacarosa. Una fase de concentración 2M resulta impenetrable para el complejo polisoma-membrana, siendo atravesada por los polisomas libres en condiciones adecuadas de campo gravitatorio y en tiempo, como demostró Bloemendal (14).

III.2.3.1.- Influencia de la concentración salina y del pH.

Las soluciones hipotónicas facilitan la homogeneización, pero es preferible romper las células en medio isotónico o ligeramente hipertónico, incluso, para evitar la rotura de mitocondrias y lisosomas. Si no es posible hacerlo así, es recomendable ajustar a isotonicidad el medio con solución concentrada de sacarosa inmediatamente después de romper las células (17).

En el caso de células de tumores ascíticos nos encontramos con una membrana citoplásmica muy resistente, por lo que generalmente se hipotonizan durante algún tiempo antes de homogeneizar.

Los polisomas en solución presentan unos requerimientos muy característicos acerca de la composición salina, así como de la concentración de los distintos cationes. Respecto al pH, son estables entre valores de 6 a 8,8, aunque generalmente se manipulan entre los de 7,2 y 8,2 (lo más frecuente es 7,6).

Para su estabilidad y mantenimiento funcional, la estructura polisómica requiere necesariamente * la presencia de K^+ y Mg^{2+} .

* Se ha visto que ambos cationes actúan en lugares propios, y que el K^+ no se puede sustituir por NH_4^+ , ni mucho menos por Mg^{2+} (108).

Los ribosomas en ausencia de K^+ se convierten en partículas muy sensibles a la RNasa, de coeficiente de sedimentación parecido al de las subunidades grandes. El proceso no es reversible.

Los polisomas son menos sensibles estructuralmente a la falta de K^+ , pero pierden la actividad "in vitro".

La cantidad de cationes monovalentes (K^+ solo o con Na^+ o NH_4^+) debe ser 10 veces la de Mg^{2+} , aunque se emplea de 2.5 a 20 veces según los casos.

El Mg^{2+} , responsable del mantenimiento de la integridad estructural del polisoma entre la concentración máxima de 0,013 M (por encima de la cual se producen agregados inespecíficos sobre todo si se altera el equilibrio con el K^+), y la mínima de 0,001 M (por debajo de la que se disocian quedando el m-RNA junto con algunas subunidades 40 S por una parte y las subunidades 60 S con el polipéptido nascente por otra), suele utilizarse en concentraciones de 0,005 a 0,0015 M, y hasta de 0,010 M (3, 5 y 17).

La fuerza iónica conseguida con los distintos iones ejerce una gran influencia sobre los ribosomas, que podemos resumir así:

1) Fuerza iónica alta (0,50 M en KCl y 0,05 M en $MgCl_2$):

a) Disocia cuantitativamente los monómeros inactivos (tanto los existentes "in vivo" como los inactivados experimentalmente) en la síntesis de proteínas, sin afectar a los activos "in vivo". La disociación es reversible; las subunidades se reasocian al ser sometidas a fuerza iónica baja. En general, los polisomas solo contienen ribosomas activos, por lo que no son afectados.

b) Cuando esta fuerza iónica está presente en el gradiente lineal de sacarosa, utilizado para fraccionar los polisomas según sus pesos moleculares, se altera, disminuyendo su valor el coeficiente de sedimentación de los tres tipos de partículas: subunidades, ribosomas y polirribosomas, (se ve un desplazamiento en el gradiente respecto a fuerza iónica menor). Por otra parte, la resolución del gradiente es mejor, sobre todo en la región de los polisomas ligeros, probablemente debido a que los cambios conformacionales son mínimos en fuerza iónica alta, manteniéndose rígida la estructura.

c) Con la fuerza iónica aumenta directamente la proporción relativa de polisomas aislados de más de 5 unidades, varía la de polisomas ligeros (apareciendo los mínimos en los valores extremos de fuerza iónica), y los monosomas presentan un mínimo para fuerza iónica media (Tabla 1).

2) Fuerza iónica baja (0,01 M en KCl y 0,0015 M en $MgCl_2$) :

Además de los fenómenos ya vistos comparativamente en los párrafos anteriores, en esta fuerza iónica los polirribosomas pueden sedimentar con los núcleos, las mitocondrias y las membranas en centrifugaciones de 15 minutos o menos, a $10.000 \times g$, sobre todo cuando se trata de tejidos o células ricos en sistemas reticulares (147).

Estos y otros estudios semejantes (5 y 48) se han desarrollado tanto con células normales como cancerosas, y los resultados son muy parecidos.

En la Tabla 1 podemos también comparar las dos técnicas de lisis celular vistas anteriormente.

En esta Memoria se hace un análisis experimental previo de ambos métodos, lisis química y homogeneización, con los sistemas celulares tumorales que se van a manejar posteriormente, ya que sus características específicas nos obligarán en principio, a adoptar uno u otro definitivamente, según la técnica que los resultados obtenidos nos indiquen como más adecuada para alcanzar nuestro objetivo.

III.2.4.- Temperatura y acción de las RNasas.

Las RNasas celulares liberada con la lisis o la homogeneización, destruyen los polirribosomas por rotura del m-RNA en los espacios interribosómicos de la cadena; esto da lugar a un conjunto de ribosomas que mantienen un fragmento de m-RNA y el polipéptido naciente. Si previamente se ha marcado isotópicamente la cadena polipeptídica, los monosomas obtenidos muestran una cierta actividad específica impropia del conjunto ribosómico normal. En esta Memoria se ha utilizado este dato de la actividad específica presentada por los monosomas como medida de la desnaturalización enzimática polisómica.

La acción de las RNasas está en función lógicamente del pH, de la temperatura y del tiempo de acción principalmente.

En células tumorales particularmente ricas en RNasas, como las HeLa y las de tumor ascítico de Ehrlich, se han encontrado (48 y 105) dos tipos principales de estas enzimas líticas. Uno presenta la actividad máxima a pH 8 y 37 ° C, pero a pH 7,4 y 0 ° C no actúa, o lo hace muy lentamente; por otra parte, es inhibido por los detergentes no iónicos. El otro tipo de enzima es el que se encuentra en los lisosomas, y se libera al romperse éstos; su pH óptimo de acción es el de 5 a 37 ° C, siendo casi inactivo a pH 7,5 y 0 ° C.

Este estudio nos lleva a concluir que realmente las RNasas no ejercen ninguna, o una muy débil, acción sobre los polisomas, manteniendo el pH a 7,5, la temperatura a 0 ° C durante todo el aislamiento, y desarrollando éste en el tiempo mínimo necesario * .

Pero algunos investigadores son partidarios de utilizar inhibidores de RNasas, sobre todo al tratarse de células de tumor ascítico de Ehrlich (43). Ninguno de los polímeros conocidos con esta propiedad (sulfato de polivinilo, sulfato de dextrano, etc.) son recomendables, ya que su acción es inespecífica, uniéndose a todas las proteínas básicas. Algunas veces los polianiones hacen el extraño efecto de disociar los monómeros. El inhibidor mas comunmente utilizado es el sobrenadante de 105.000 x g de homogenado de hígado de rata, obtenido por Roth (119) y modificado por Blobel (16).

Nosotros no hemos utilizado ningún tipo de inhibidor por no introducir nuevos factores que puedan afectar a la estructura polisómica. Simplemente hemos utilizado las propiedades químico-físicas de las RNasas para eludir su acción (pH, temperatura y tiempo). Como se verá por los resultados obtenidos, no se produce degradación.

* Así lo demuestra experimentalmente Gielkens (48) en células normales y HeLa. Nuestros propios experimentos también lo confirman, como veremos.

III.2.5.- Purificación del crudo citoplásmico.

En general se hace por centrifugación diferencial, eliminando primero los - núcleos y células enteras (700 a 1.000 x g), y a continuación las mitocondrias y membranas (10.000 x g). Después de la lisis química sólo es necesario eliminar los núcleos, ya que las membranas han sido solubilizadas por el detergente.

Tanto en la pella nuclear como en la mitocondrial, anteriormente citadas, - pueden aparecer polisomas atrapados durante la centrifugación, o bien ligados a membranas. Por ello, en este trabajo se hace un estudio cuantitativo y cualitativo de los polisomas "perdidos" durante el proceso de purificación del crudo.

III.2.5.1.- Obtención de polisomas libres y unidos a membranas por separado.

Uno de los objetivos de este trabajo es diferenciar, dentro de cada línea celular utilizada, entre polirribosomas libres en el citoplasma y los que forman parte integrante del retículo endoplásmico rugoso, así como sus respectivas actividades de síntesis. Para ello se aislaron y estudiaron por separado ambos tipos polisómicos.

Ya se ha hecho referencia anteriormente a este punto, en el apartado correspondiente a homogeneización (III.2.3.).

Nosotros seguimos la misma técnica empleada por Bloemendal (14), basada en la gran diferencia de peso molecular y volumen existente entre polisomas libres (muy densos) y los unidos a membranas que mantienen intacta esta unión (menos densos).

Se han comprobado experimentalmente que no se produce ninguna alteración estructural en los polisomas al sedimentar a través de la fase de sacarosa 2 M.

CONDICIONES EXPERIMENTALES

IV.- MATERIALES Y METODOS.

La labor experimental llevada a cabo en este trabajo está doblemente condicionada: por una parte, nos movemos en el ámbito de la célula viva con todos sus requerimientos y características biológicas bien conocidas; por otra, el objeto de nuestro estudio es el aspecto molecular de un biopolímero. Ambas circunstancias unidas influyen sobre la metodología empleada. Así, nuestro deseo de obtener los polisomas en un estado lo más cercano posible al que presentan "in vivo" nos obliga a no alterar en absoluto las condiciones rutinarias de mantenimiento celular, que se consideran fisiológicas, y a realizar una serie de comprobaciones de la constancia de sus características biológicas. - Cuando esas condiciones deben ser cambiadas para obtener poblaciones sincronizadas, se comprueba asimismo que este hecho no afecte a las constantes biológicas.

Y por último, el proceso de aislamiento de los polisomas es cuidadosamente elegido después de comprobar experimentalmente el resultado obtenido al utilizar los que parecían más aconsejables desde un punto de vista teórico, teniendo en cuenta las características macromoleculares conocidas.

En este capítulo comentaremos los aspectos relacionados con las metodologías de mantenimiento, sincronización, y caracterización celulares, y en especial con las de aislamiento de polirribosomas.

IV.1.- PRODUCTOS.

Todos los productos químicos empleados en este trabajo fueron de pureza analítica de la casa Merck o BDH.

El hidrolizado proteico $[^{14}\text{C}]$ de partida tiene una actividad específica de $57 \mu\text{Ci/mAtomo C}$ y una concentración de 1 mCi/ml ; procede de Radiochemical Center (Amersham).

El detergente no iónico, Triton X-100, utilizado es de la casa Sigma.

Las autorradiografías se realizan con emulsión NTB2 de Kodak.

El Durcupan AC/M de las inclusiones para microcopía electrónica es de la casa Fluka.

IV.2.- MATERIAL BIOLOGICO DE PARTIDA.

Los polisomas de las células de tumores ascíticos han sido estudiados en diferentes ocasiones, pero sorprendentemente no se ha encontrado una uniformidad entre las respuestas de cada clase de tumor.

Todos estos tumores crecen en suspensión en el líquido ascítico que les acompaña. Esto es una ventaja para su manejo y mantenimiento por pases seriados de ratón a ratón; ambas manipulaciones se pueden realizar simplemente por succión (avenado) e inyección intraperitoneal.

Además de ésta, presentan las ventajas de un crecimiento rápido "in vivo", y de estar constituidos por células uniformes *. Algunas cepas provocan, de

* Las células malignas pueden estar acompañadas por mesotéllicas desprendidas y por leucocitos, sin embargo, las no malignas se encuentran en tan pequeña cantidad que las muestras pueden ser tomadas como formadas enteramente por células cancerosas.

forma esporádica, hemorragias peritoneales al ratón, por lo que las células malignas aparecen mezcladas con las de la sangre. No se conoce cuál es la verdadera causa de este fenómeno bastante frecuente.

Se pueden adaptar a crecimiento "in vitro", aunque en estas condiciones es mas lento y, en algunos casos, difícil de conseguir. Durante el proceso de establecimiento se observa un considerable grado de selección celular.

El tejido originario es carcinoma mamario, que troceado e inoculado intraperitonealmente, da lugar a tumores sólidos en un 80% de los casos, y el resto son líquidos.

Se quiso tomar como control de actividad polisómica tumoral la hallada en células normales homólogas a las cancerosas. Estrictamente, éstas deberían ser por tanto de tejido mamario de ratón, pero la complejidad que ello implicaba (ya que es necesario partir de una gran cantidad de células en cada experimento), nos hizo decidirnos por cultivos primarios de embrión de ratón. Estos están constituidos por un conjunto heterogéneo de células, que no han sufrido el proceso de total adaptación al medio de crecimiento semidefinido * con la selección celular que ello implicaba. Así, el cultivo primario no se puede ya considerar como un tejido "in vivo", puesto que se ha mantenido y reproducido "in vitro", sin que constituya, por otra parte, una línea celular establecida. Es decir, tiene un caracter intermedio entre ambos.

Las células tumorales de partida eran las mantenidas "in vivo" por pases seriados de ratón a ratón, o bien las ya establecidas como línea celular "in vitro". Por ello el control normal debía ser un tejido recién aislado, o una línea claramente establecida. Esto último se había conseguido en el Departamento a

* Medio semidefinido es el compuesto por una parte química bien determinada, y otra orgánica, en general, suero sanguíneo de mamífero.

partir de un cultivo primario de embrión de ratón. En el momento de iniciar nuestros estudios se encontraba en el pase número 68, y perfectamente caracterizada, por lo que constituía un material idóneo:

Vamos a ver las características concretas de las células de partida de este trabajo.

IV.2.1.- Células normales.

Como acabamos de decir, se tomó una línea establecida en el Departamento a partir de cultivo primario de embrión de ratón: células ERGAN.

Morfológicamente está constituida por dos tipos de células: epitelioides y fibroblásticas. Cromosómicamente, presenta dos troncos modales, uno de 40 (39-45), y otro de 70. Las pruebas de tumorigenicidad * en ratones Swiss recién nacidos son negativas en el 100% de los casos.

Rutinariamente se mantiene a 37° C en cultivos en monocapa con medio R5a de McCoy (86), suplementado con un 10% de suero de ternera (Tabla 2) más 100 U.I./ml de penicilina y 100 g/ml de estreptomycin. Los cultivos se cambian de medio cada dos días, y se subcultivan una vez por semana, sembrándose 150.000 células/ml. El crecimiento en esas condiciones llega a ser de 3 veces la cantidad inicial.

Para los experimentos aquí descritos se cultivaron en frascos de Rous de 75 ml, y se recogieron en fase logarítmica de crecimiento, es decir, al 6º día de la siembra, según la curva de la figura 1, tripsinizando la monocapa con solución de tripsina al 0,20% en GKN ** durante 15 a 20 minutos a 37° C.

* Se realizaron inoculando varios lotes de ratones por vía subcutánea con 0,1 ml de suspensión celular ($5 \text{ a } 10 \times 10^6$ células/ml) en solución salina isotónica.

** GKN es una solución salina equilibrada compuesta de: Glucosa (1,0 g/l), KCl (0,4 g/l), NaCl (8,0 g/l), y rojo fenol (0,002%). No daña la membrana celular.

TABLA - 2 - Medio de cultivo R5a de McCoy.
Composición y forma de prepararlo.

Medio R5a de McCoy (86) utilizado en los cultivos en monocapa. Composición final por litro :

1. Solución de Hanks (55), sin bicarbonato : NaCl (8'0 g), KCl (0'4 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0'2 g), $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ (47'8 mg), KPO_4H_2 (60'0 mg), glucosa (1'0 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (276, '1 mg).
2. Solución de aminoácidos : 1-triptófano (3'1 mg), 1-fenilalanina - (16'5 mg), 1-tirosina (18'1 mg), 1-arginina (HCl) (42'1 mg), 1-histidina (HCl) (20'9 mg), 1-lisina (HCl) (36'5 mg), 1-cisteína (31'5 mg), 1-metionina (14'9 mg), 1-isoleucina (39'3 mg), 1-leucina (39'3 mg), 1-valina (17'6 mg), 1-treonina (17'9 mg), 1-asparagina (45'0 mg), glicina (7'5 mg), 1-serina (26'3 mg), alanina (13'4 mg), prolina (17'5 mg), hidroxiprolina (19'7 mg), ácido aspártico (19'9 mg) ácido 1-glutámico (22'1 mg).
3. Solución de vitaminas : tiamina (HCl) (0'2 mg), riboflavina (0'2 mg) piridoxal (HCl) (0'5 mg), piridoxamina (HCl) (0'5 mg), ácido nicotínico - (0'5 mg), nicotinamida (0'5 mg), pantotenato cálcico (0'2 mg), biotina (0'2 mg) ácido fólico (0'2 mg), cloruro de colina (5'0 mg), inositol (36'0 mg), ácido - p-aminobenzoico (1'0 mg), ácido ascórbico (0'5 mg), glutatión (0'5 mg), - cianocobalamina (0'75 mg).
4. Rojo fenol : 0'002%
5. Neomicina : 0'1 g.
6. NaCO_3H : 0'07%

TABLA - 2 - (Continuación)

- 7. Glutamina : 219,2 mg.
- 8. Glucosa : 0,2%.
- 9. Hidrolizado de lactoalbúmina : 5,0 g.

Las soluciones 1 y 2 (de Hanks y de aminoácidos respectivamente) se preparan previamente por separado a una concentración 10 veces la indicada, se esterilizan por ultrafiltración, y se guardan a -20°C .

La solución 3 de vitaminas se prepara concentrada 50 veces, se esteriliza también por ultrafiltración y se guarda a -20°C .

El rojo fenol se guarda en soluciones al 1%, y el bicarbonato sódico al 1,4%, ambas en condiciones de esterilidad.

Una vez preparado el medio químicamente definido (medio base), se esteriliza el conjunto por ultrafiltración, y se suplementa con el 10% de suero de ternera también preparado en el Departamento. Se guarda a 4°C hasta su utilización, sin que sobrepase los 15 o 20 días.

IV.2.2.- Células cancerosas.

Partimos de cancer ascítico de Ehrlich. Morfológicamente son células de carcinoma de mama de ratón, adaptadas según un proceso como el descrito por G.Klein (73) por el que crecen libres en el líquido ascítico segregado por el peritoneo.

El desarrollo del tumor se produce en dos fases claramente diferenciadas :

a) En la primera, las células tumorales recién inoculadas invaden el tejido peritoneal antes de que se produzca exudado ascítico. Esta fase se denomina primera infiltración.

b) Cuando el fluido aparece, las células cancerosas crecen libres en él. En cada generación, algunas de estas células se introducen en el peritoneo; a esta fase se la denomina segunda infiltración.

En cada infiltración puede llegar a producirse una masa tumoral sólida. Es decir, se producen cuatro tipos de crecimiento celular :

- 1) Infiltración primaria
- 2) Infiltración secundaria
- 3) Crecimiento libre en el líquido ascítico
- 4) Implantación sólida

El último no se produce necesariamente; sin el primero no se produce ascitis, y no puede haber infiltración secundaria si no hay crecimiento libre de las células en el fluido.

No se ha llegado a un acuerdo sobre cuál es el mecanismo de producción del líquido ascítico. La teoría de la presencia de un virus o factor vírico no ha podido mantenerse (40) * . Tampoco se ha determinado por qué se produce

* Los experimentos realizados en el Departamento, en esta misma línea, tampoco detectan ningún tipo de actividad vírica.

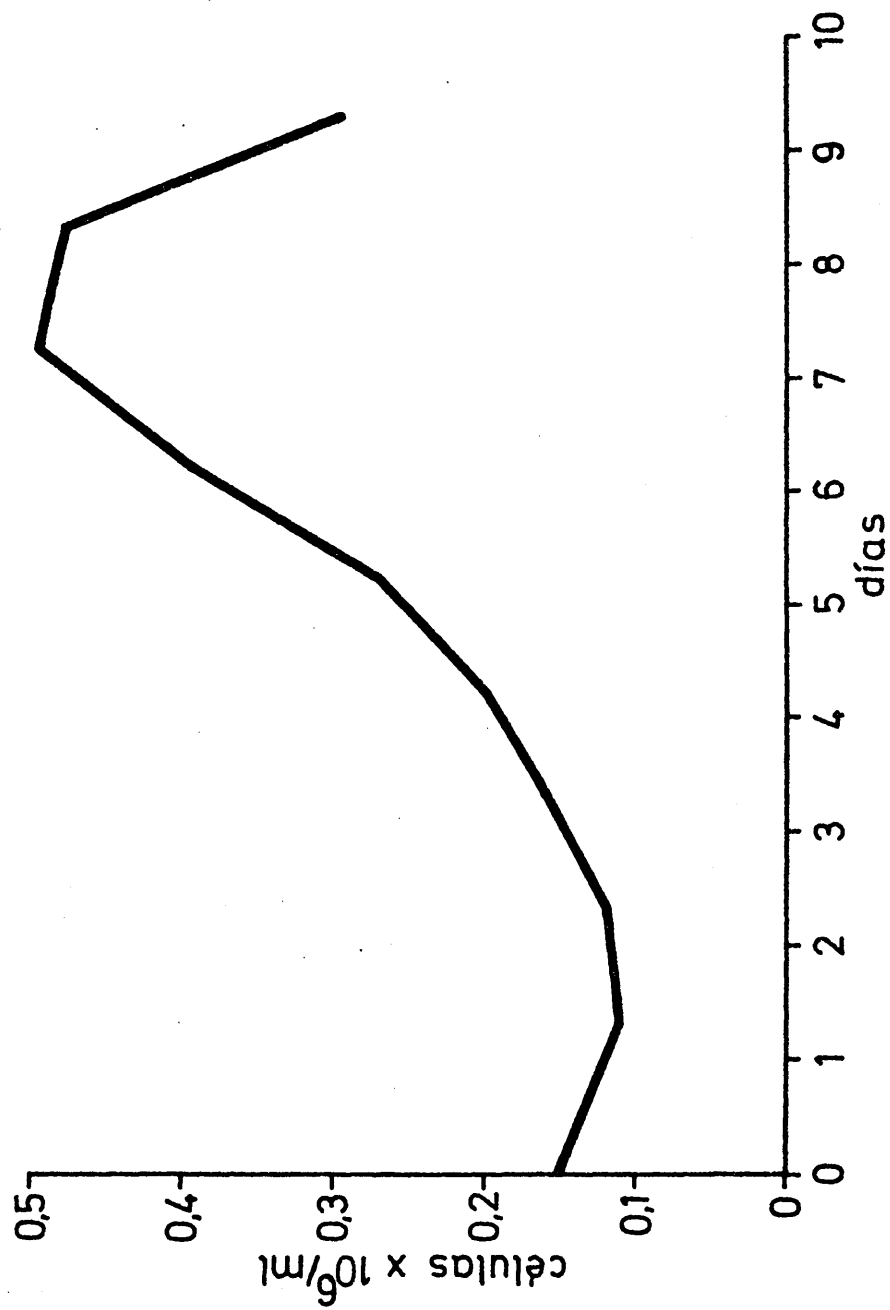


FIGURA 1.- Curva de crecimiento de células ERGAN, cultivadas en monocapa con medio R5a de McCoy suplementado con 10% de suero de ternera (Tabla 2). Se siembra un lote de 15 frascos Jena de 15 ml con 150.000 - células/ml. Cada punto es el valor medio de los recuentos celulares efectuados a partir de dos frascos. Las células se separan por tripsinización.

algunas veces hemorragia peritoneal desde el quinto día de la inoculación, habiendo otras cepas en las que no se produce nunca o muy raramente.

Nosotros hemos trabajado con dos cepas diferentes :

a) Produce siempre tumores hemorrágicos desde el quinto o séptimo día de la inoculación. La denominaremos abreviadamente CAE (Cancer - Ascítico de Ehrlich).

b) Sus tumores nunca son hemorrágicos antes del día 16 a partir de la inoculación; la hemorragia suele aparecer entre los días 16 al 20, y pocos después, el ratón muere. En cualquier caso la hemorragia es muy pequeña. La llamaremos CAEL, ya que procede directamente de los laboratorios Ehrlich-Lettré.

De esta forma podremos ver si esa gran diferencia de comportamiento de dos cepas tumorales tan próximas genéticamente se refleja en la actividad poli-sómica.

Cromosómicamente, ambas cepas son hiperdiploides; la mayor parte de las células oscilan entre 43 y 46 cromosomas (número modal: 40).

Ambos tumores se mantienen "in vivo" por pases seriados (cada 9 ó 10 días) en ratones Swiss albinos de 2 a 4 meses de edad (20 a 25 g) *.

Se inoculan traperitonealmente $3,0 \times 10^6$ (de CAE) y $2,0 \times 10^6$ células (de CAEL) en 0,5 ml de SSS-I (Tabla 3) a cada animal, pudiendo usarse hembras o machos indistintamente; en este trabajo se tomaron hembras exclusivamente. Con estas condiciones, se producen sólo tumores líquidos en el 100% de los casos.

* Se ha comprobado que la congelación y descongelación de estos tumores hace perder especificidad frente al huésped a las células (94). Por ello se prefiere mantenerlos "in vivo".

Las células se recogen por punción peritoneal succionando con una jeringuilla. También en este caso se eligió la fase logarítmica de crecimiento para realizar el estudio ribosómico, que según las curvas mostradas en las figuras 2 y 3, corresponde al 8º y 9º día de inoculación - respectivamente. Antes de esa fecha el tumor es poco voluminoso y muy denso celularmente, por lo que su aislamiento se hace muy trabajoso, - siendo necesario "lavar" el peritonéo con inyecciones de solución salina.

Las líneas CAE y CAEL "in vivo" fueron adaptadas a mantenimiento en cultivos en suspensión, según el proceso que se describe en el siguiente apartado. Así, las células crecen a 37° C en medio B, de S.Kit (72) (Tabla 3), suplementado con 20% de suero de ternera y las cantidades habituales de penicilina y estreptomicina. Este medio es una modificación del R5a de McCoy (Tabla 2).

Es necesario subcultivar la población celular dos veces por semana. Se siembran en tubos Kimax, 25 ml de suspensión celular con una densidad de 250.000/ml, y se cambian de medio diariamente. En estas condiciones se alcanza la fase de crecimiento logarítmico al 3º ó 4º día de la siembra (Figuras 4 y 5), que es cuando se toman para efectuar el estudio desarrollado en este trabajo.

Las células CAE "in vitro" se encontraban en el pase nº 48 y las CAEL en el nº 30 en el momento de iniciar los experimentos.

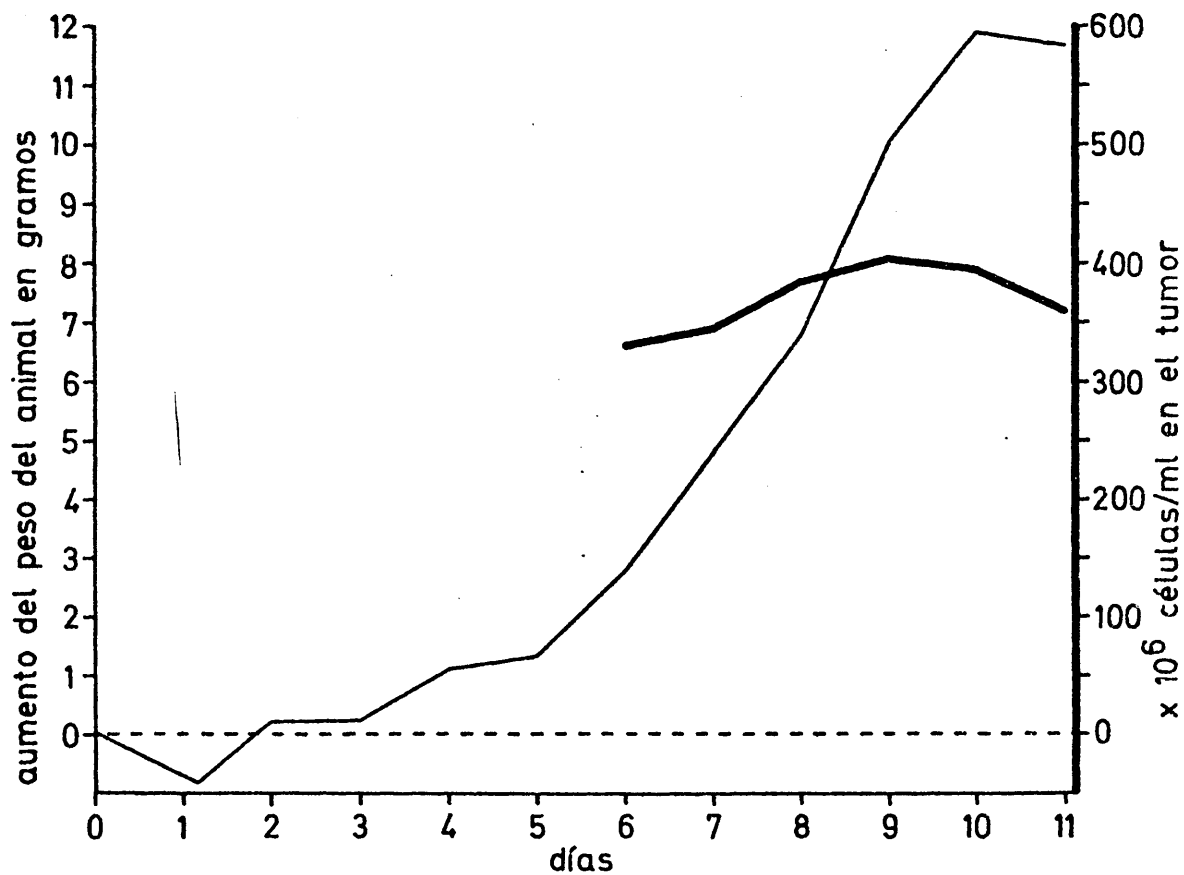


FIGURA 2.- Curva de crecimiento de tumor ascítico de Ehrlich. Cepa - hemorrágica (CAE). Mantenido por inyección intraperitoneal en pases seriados de ratón a ratón de $3,0 \times 10^6$ células en - 0,5 ml. Valor medio de 15 ratones.

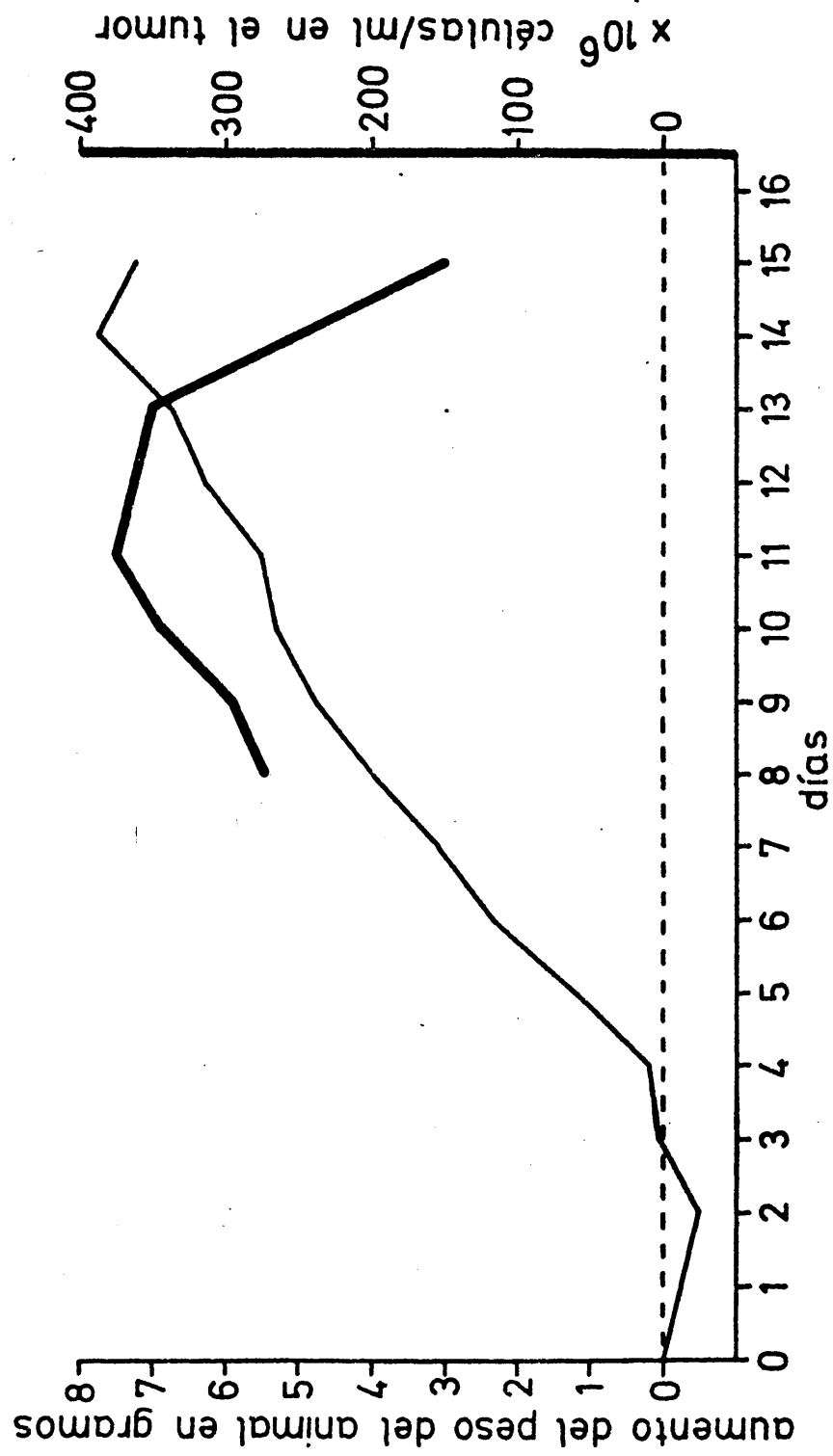


FIGURA 3.- Curva de crecimiento de tumor ascítico de Ehrlich-Létré (CAEL). Mantenido "in vivo" inyectando intraperitonealmente 2×10^6 de células en ratones de 2 a 4 meses de edad. Valor medio de 15 ratones.

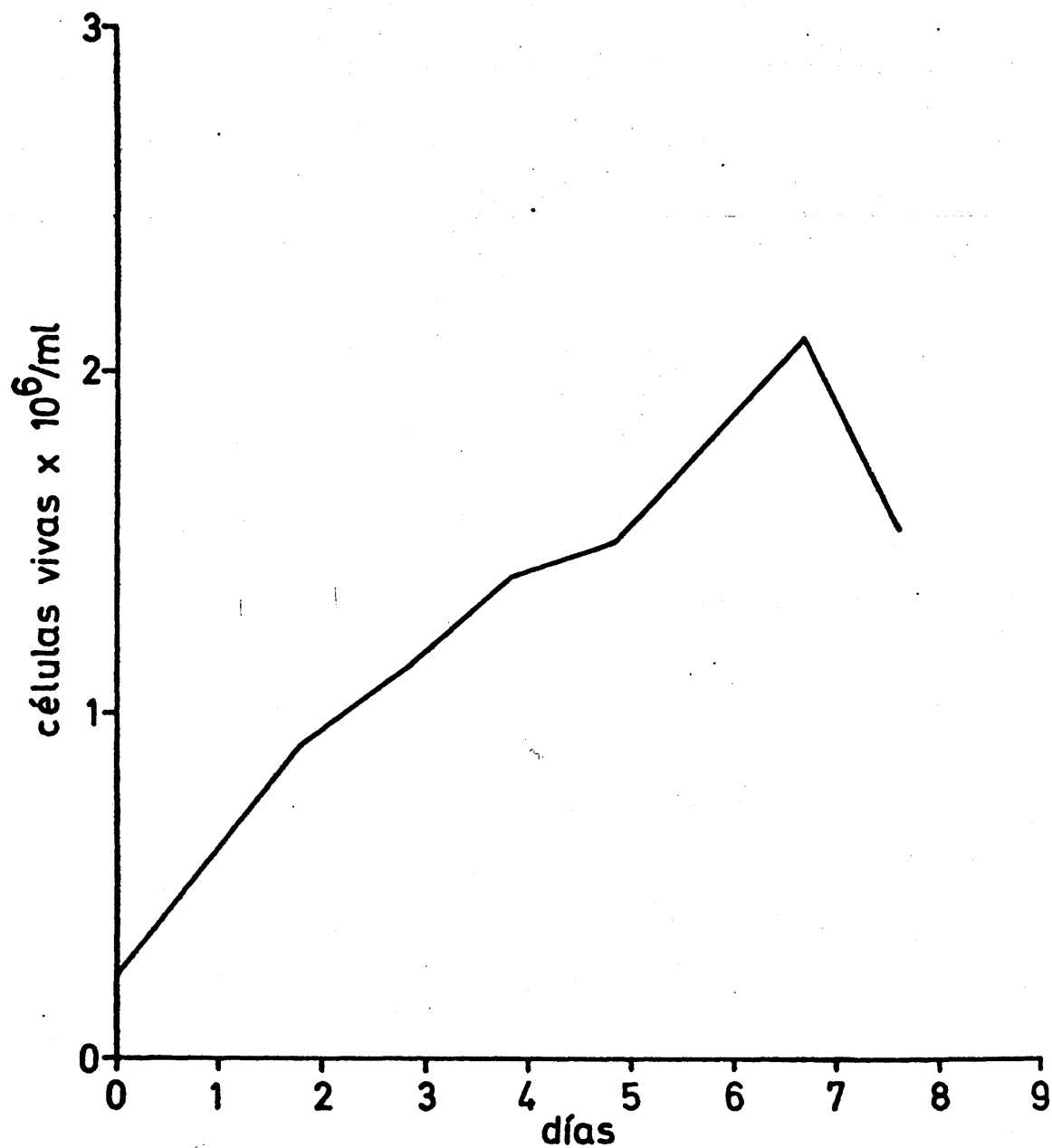


FIGURA 4.- Curva de crecimiento de células CAE cultivadas en suspensión en medio B suplementado con 20% de suero de ternera (Tabla 3). Se siembra un lote de 22 tubos Kimax con 25 ml. de suspensión celular de 250.000 células/ml. Valor medio de 3 tubos en cada punto.

TABLA - 3 - Medio de cultivo B
Composición y preparación.

Medio B de Kit (72) utilizado en los cultivos en suspensión; es una modificación del medio R5a ya descrito. Composición final por litro :

1. Solución salina para suspensión (SSS-I): NaCl (8,0 g), KCl (0,4 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,2 g), $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ (47,8 mg), KPO_4H_2 (60,0 mg), glucosa (3,0 g), rojo fenol (0,002 %).
2. Solución de aminoácidos : la misma del R5a.
3. Solución de vitaminas : la misma del R5a.
4. Neomicina : 0,1 g.
5. NaCO_3H : 2,0 g.
6. Oxalacetato sódico : 0,15 g.
7. Glutamina : la misma cantidad que en el R5a.
8. Hidrolizado de lactoalbúmina : 5,0 g.

Agua desionizada y tridestilada c.s.p. 1.000 ml.

Como en el medio anterior, después de esterilizar el conjunto del medio - base, se añade el 20% de suero de ternera.

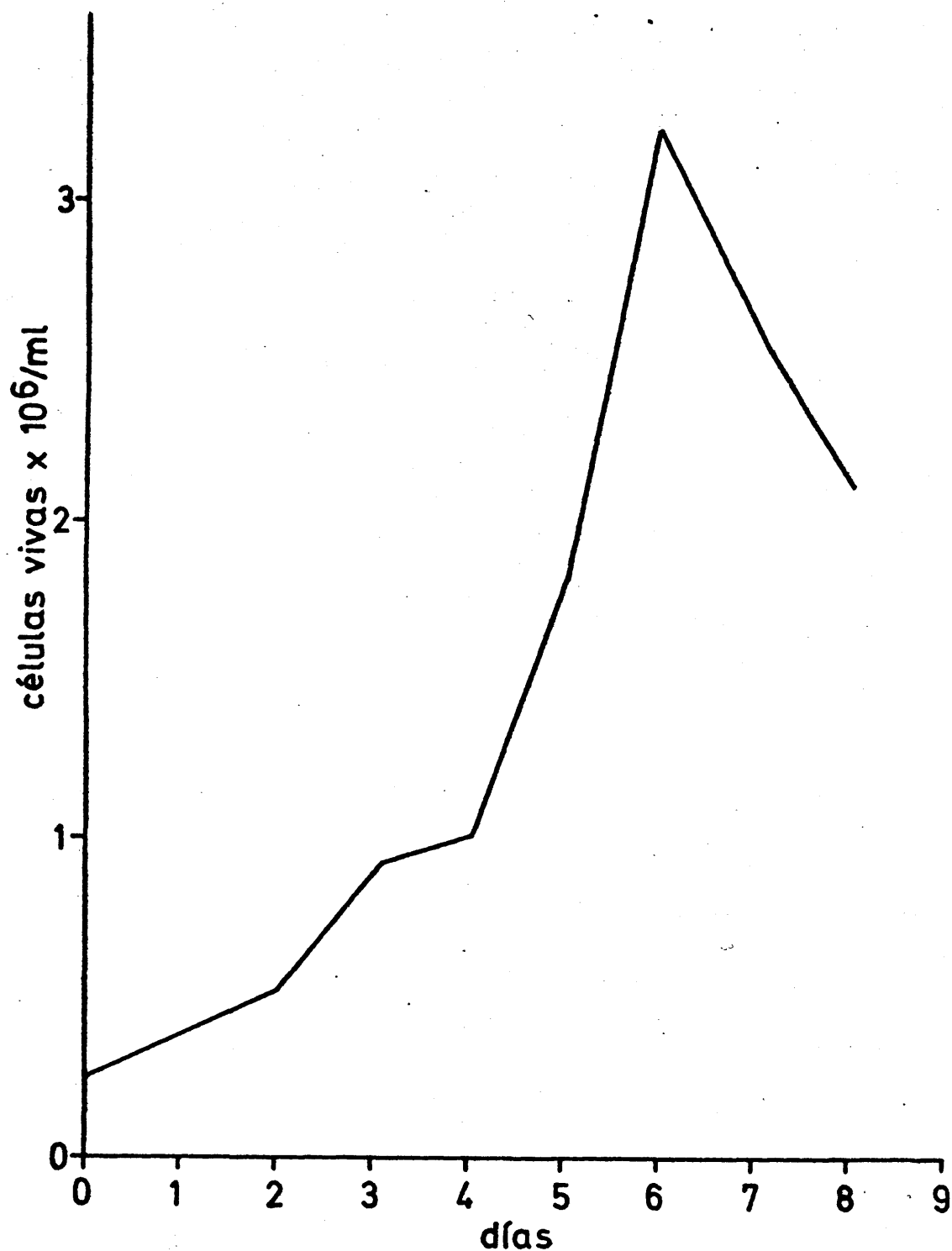


FIGURA 5.- Curva de crecimiento de células CAEL cultivadas en suspensión en medio B suplementado con 20% de suero de ternera (Tabla 3). Se siembra un lote de 22 tubos Kimax con 25 ml de suspensión celular de 250.000 células/ml. Valor medio de 3 tubos en cada punto.

IV.2.3.- Establecimiento de la línea celular CAEL "in vitro".

Según la mayor parte de los estudios realizados, las células de cancer ascítico de Ehrlich presentan "in vitro" un crecimiento mucho más lento que - "in vivo", y, a menudo, difícil de conseguir.

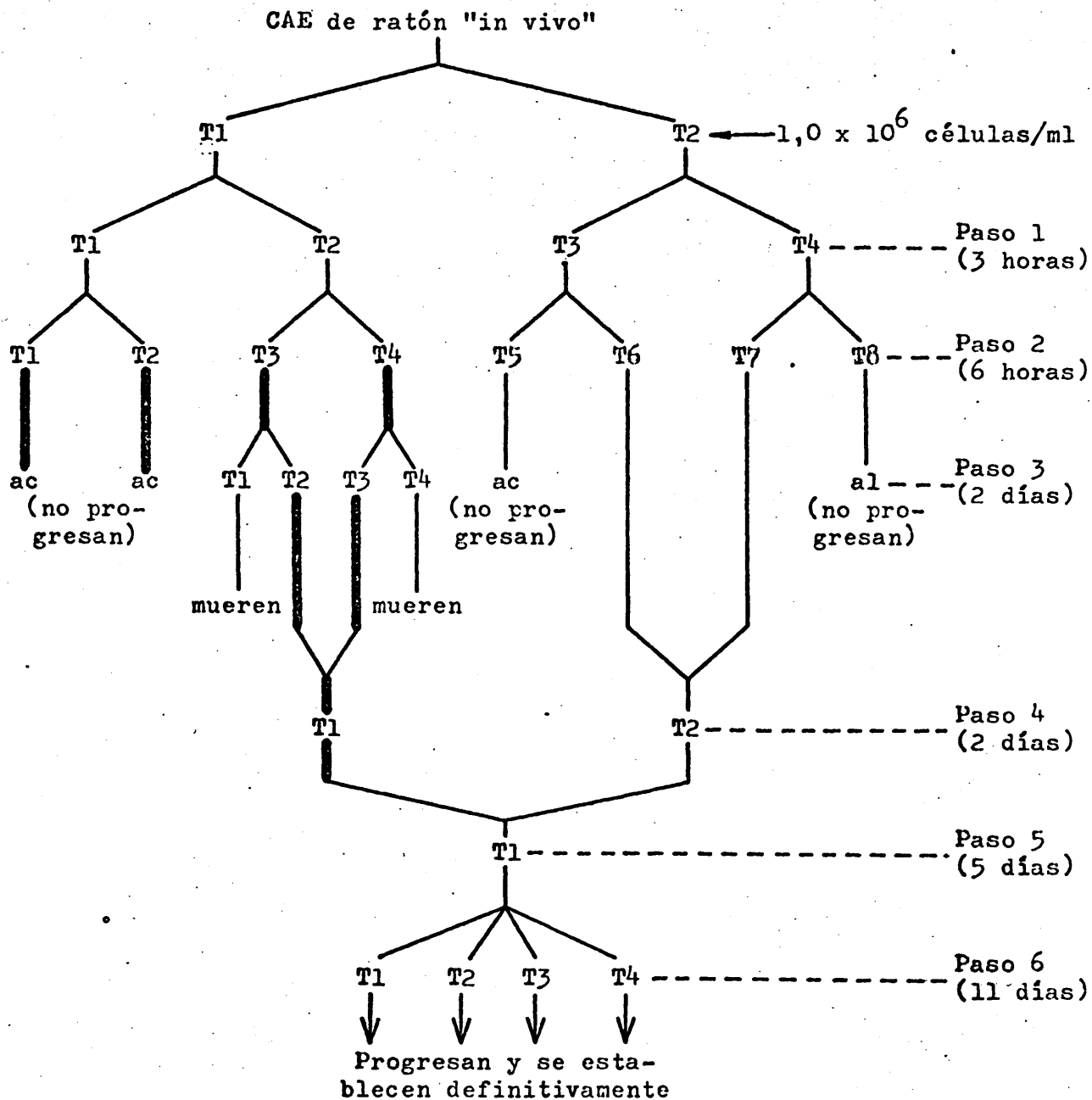
Los medios muy ricos, conteniendo altos niveles de suero, suelen favorecer el establecimiento en cultivos en monocapa; por otra parte, se observa un considerable grado de selección celular durante el proceso (92).

Se eligió el sistema de cultivo en suspensión por ser mucho más ventajoso que el de monocapa, ya que se consiguen poblaciones de crecimiento muy rápido en menor espacio, y con facilidad de maniobras. Se encuentran descritas varias técnicas de establecimiento en cultivos en la literatura (43, 54, 92 y 140), en las que cada autor utiliza unos medios y unas condiciones diferentes. En general los cultivos primarios se hacen con poblaciones numerosas (de 4 a 8×10^5 células/ml) en medios ricos en aminoácidos y suero.

En nuestro caso, y tras repetidos intentos infructuosos, se consiguió de la manera que se describe a continuación y se resume en el Esquema 2.

Se avénó un ratón inoculado 10 días antes con CAEL (no hemorrágico). Las células se lavaron con SSS-I a 37°C , recogién dose por centrifugación a $80 \times g$, 5 minutos. La pella celular se resuspendió en medio de cultivo B suplementado con 20% de suero de ternera, y se sembraron dos tubos Kimax con 25 ml de una suspensión de 1×10^6 células/ml. Tres horas más tarde, el medio estaba ácido (lo que indica metabolización celular), por lo que se diluyeron los cultivos añadiendo medio fresco hasta concentración celular de 5×10^5 ml. En el transcurso de 6 horas se produjo el mismo fenómeno, y se volvió a diluir el cultivo quedando en la proporción de $2,5 \times 10^5$ células/ml. En las 24 horas siguientes a la última dilución, el metabolismo celular continuaba siendo muy activo, por lo que se cambió el medio dos veces (distanciadas 12 horas), dejando siempre un 20% de medio condicionado. En días

ESQUEMA DEL ESTABLECIMIENTO DE LAS CELULAS DEL CANCER
ASCITICO DE EHRLICH EN CULTIVOS EN SUSPENSION "IN VITRO".



T = tubo; ac = pH ácido; al = pH alcalino; CAE = Cáncer ascítico de Ehrlich;

= mantenidas con medio condicionado.

posteriores, se observó el crecimiento celular, y se seleccionaron las poblaciones que mejor se adaptaban. El pH del medio y su riqueza nutritiva se mantuvieron constantes adicionando medio fresco cuando era necesario. Una vez alcanzadas densidades de población de aproximadamente 1×10^6 células/ml, se efectuaron subcultivos, sembrándose $2,5 \times 10^5$ y 5×10^5 células/ml en medio condicionado al 50%. El crecimiento celular disminuyó aumentando el porcentaje de células muertas; entonces, se mancomunaron los tubos de forma que la población se mantuviese en 3 a 5×10^5 células vivas por ml como mínimo. Todos los cambios de medio se hicieron dejando el 50% de medio condicionado. Así, vivieron durante 15 días, al cabo de los cuales se alcanzó una población de 13×10^5 células vivas por ml, que se subcultivó sembrándose 3×10^5 células vivas por ml. A partir de ese momento, el crecimiento fué regular, siendo necesario renovar el medio diariamente, y subcultivar dos veces por semana.

Las pruebas de tumorigenicidad realizadas inoculando intraperitonealmente 10 ratones Swiss de tres meses de edad con 5×10^6 células en 0,5 ml de SSS-I, fueron positivas; se produjeron tumores ascíticos en todos los casos, con la particularidad de ser hemorrágicos.

IV.3.- CARACTERIZACION de las LINEAS CELULARES DESCRITAS. TECN CAS más IMPORTANTES.

Cada línea celular establecida presenta una serie de propiedades morfológicas, cinéticas y bioquímicas, que la definen. Estas características son función del medio ambiente en que se desenvuelve la vida celular, y, en su caso, del sistema de cultivo elegido; dependen sensiblemente, entre otros muchos factores, de la presión, temperatura, aireación (composición química de la atmósfera que las rodea), iluminación, riqueza

y composición del medio de crecimiento, pH, sistemas de cultivo (monocapa, suspensión, etc.), e incluso, influye el material de los frascos y tubos en los que el cultivo se lleva a cabo.

Cuando se fijan las condiciones en las que se desarrolla una población, sus propiedades permanecen relativamente constantes; no obstante con el tiempo, en los sucesivos pases de mantenimiento rutinario, siempre se produce alguna alteración, por lo que al iniciar un experimento concreto, es recomendable, y a veces necesario, caracterizar nuevamente la línea celular, al menos respecto de aquellas propiedades más relacionadas con aquél.

IV.3.1.- Control morfológico.

Se lleva a cabo principalmente con tres procesos:

- 1) Microscopía óptica
- 2) Microscopía electrónica
- 3) Estudio cromosómico

No vamos a entrar en detalles de estas técnicas, ya que son sobradamente conocidas. Solo nombraremos los sistemas utilizados.

1º. Las preparaciones para microscopía óptica se tiñeron con hematoxilina-eosina.

2º. Las pellas celulares para microscopía electrónica se -
prefijaron con solución de glutaraldehído al 3% en buffer de Millonig (90 y 91), se fijaron con solución de OsO_4 al 1% en buffer de Palade (102 y 103), y después de deshidratar con acetona, se incluyeron en Durcupan AC/M. -
Los cortes se contrastaron con citrato de plomo en solución de Reynolds (115).

3º. Los cariotipos se determinaron como describen T.C.Hsu et al. (67), dando un pulso con Colcemid ($0,06 \mu\text{g/ml}$ a 37°C durante 18 horas) para detener y acumular células en mitosis, liberando posteriormente

los cromosomas con choque hipotónico, seguido de fijación con Carnoy y rápido secado al aire, o bien con choque hipotónico seguido de tinción con orceína acética, y presionando fuertemente el "cubre" sobre el "porta", de forma creciente, rotando el pulgar sobre la preparación, evitando deslizamientos.

IV.3.2.- Control cinético.

Se han realizado dos estudios referentes a la dinámica de las poblaciones celulares :

- Curva de crecimiento
- Ciclo celular.

IV.3.2.1.- Curva de crecimiento.

En las figuras 1 a 5 se muestran las curvas de crecimiento de las líneas celulares utilizadas. Del cultivo en monocapa (ERGAN) se sembraron lotes de 15 - frascos "Jena" (15 ml). Diariamente se ha hecho recuento de células vivas y muertas, de dos frascos separadamente. Para ello se tiñeron las muertas con - eritrosina al 0,09% concentración final.

El crecimiento de los cultivos en suspensión (CAE y CAEL) se ha registrado tomando el valor medio de 3 tubos por punto. Se sembraron lotes de 22 tubos. También se han contado las células vivas y muertas usando eritrosina 0,09%.

En el caso de los tumores ascíticos, se siguió el aumento de peso del animal desde el día de la inoculación. Cuando fué posible, se practicó el avenado, extrayendo talmente el tumor y lavando el peritonéo con volúmenes conocidos de GKN; se procedió al recuento celular como en los casos anteriores. Se inocularon lotes de 15 ratones, utilizando hembras de 25 g. de peso (2-4 meses de edad).

IV.3.2.2.- Ciclo celular.

Un número mayor de datos referentes a la cinética del cultivo o del tumor, nos los proporciona el estudio del ciclo celular representado con cuatro etapas, G_1 , S, G_2 , y M, según hicieron Howard y Pelc (66) - (Esquema 3).

El proceso seguido técnicamente fué un poco distinto, según partiésemos de células "in vivo" o "in vitro"; y dentro de las "in vitro", si el cultivo crecía en monocapa o en suspensión.

En general se comenzó por dar a las células en fase de crecimiento logarítmico, un pulso de 30 minutos con solución de TdR-metil $[^3H]$ de 2 $\mu Ci/ml$ (concentración final) en medio del cultivo condicionado (1 : 1). Se lavan abundantemente con solución de TdR fría de 1 $\mu g/ml$ (concentración final) en medio de cultivo. Se decanta el último lavado, y se deja, a 37° C, en medio condicionado (1 : 1). Se toman muestras cada 2 horas por espacio 34-36 horas consecutivas.

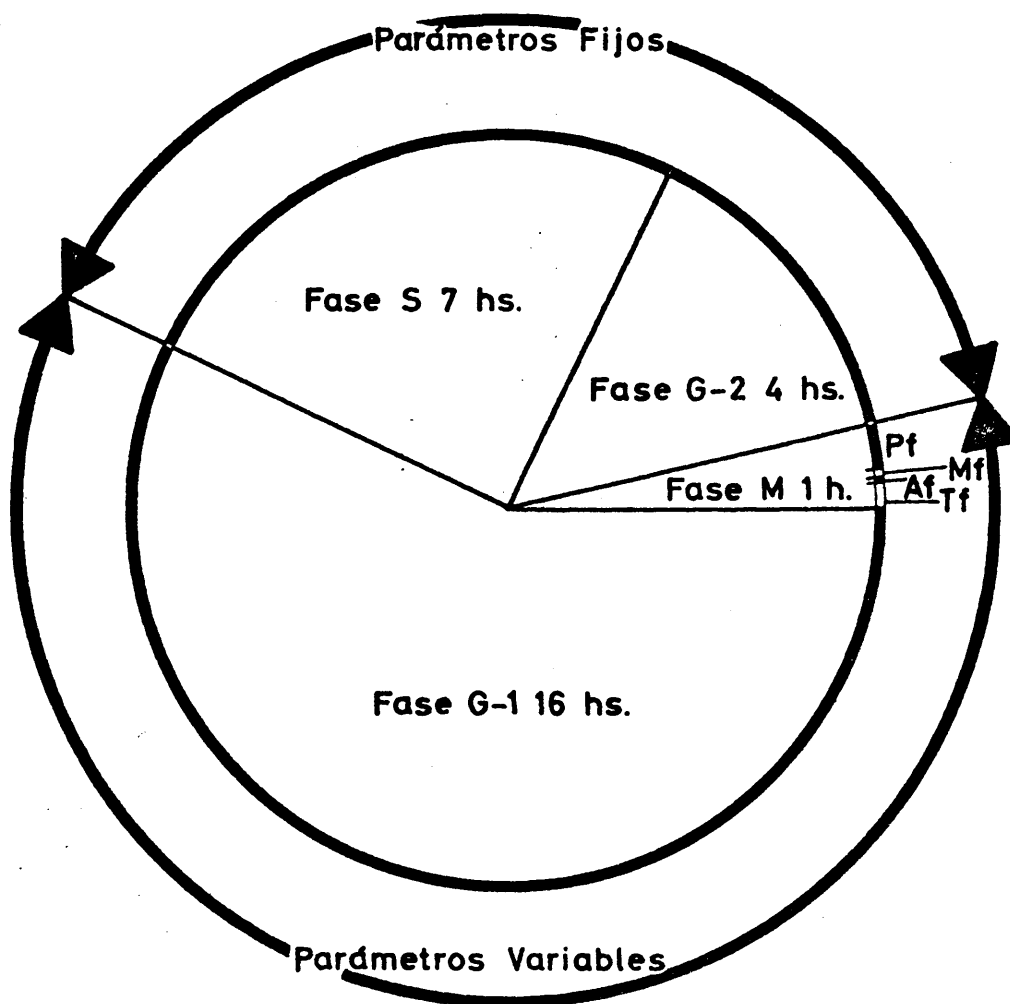
Para simplificar esta última parte del proceso y que resultase más cómoda, se dividió el lote de tubos destinados al experimento, en dos grupos iguales y se marcó el segundo con TdR $[^3H]$ 12 horas más tarde que el primero - (Esquema 4). Este desfase permitió hacer las tomas de las 12 a las 24 horas al día siguiente, simultaneando con las de las 24 a las 36 del primer grupo.

Las muestras se lavan abundantemente con SSS-I a 37° C hasta eliminar totalmente el suero que acompaña al medio*. Si las células han crecido en monocapa, en tubos de Leighton (con un "cubre" en su carilla plana), se -

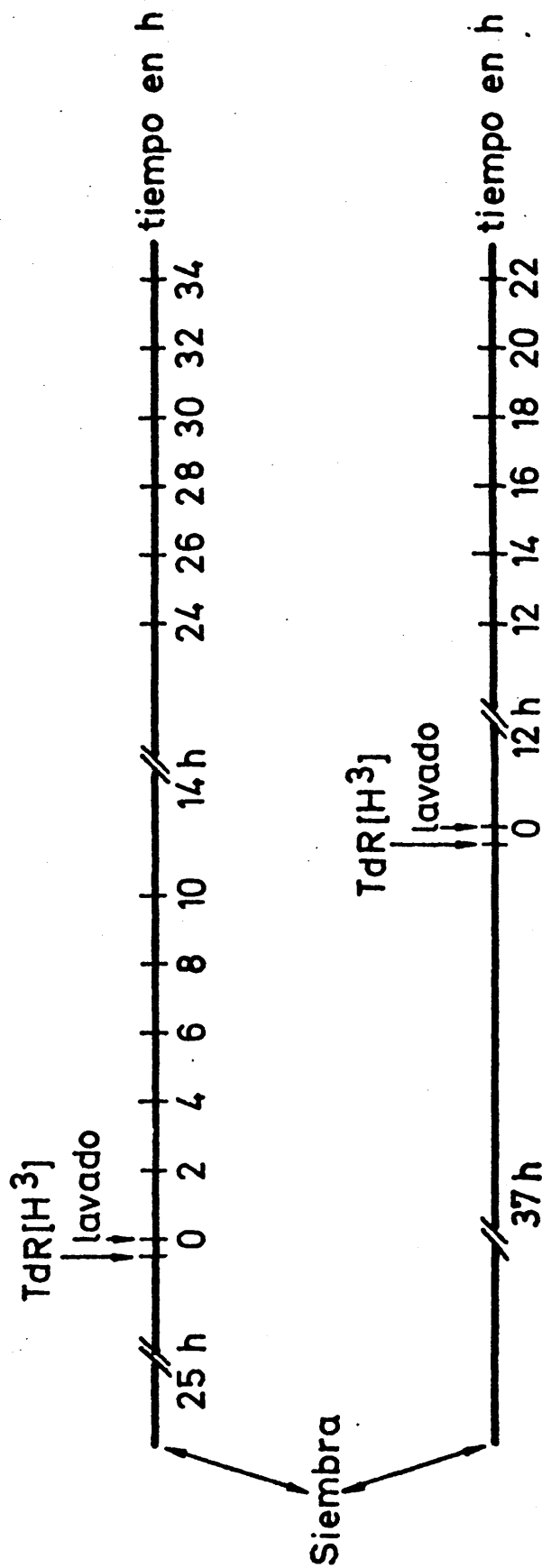
* El suero afecta a la tinción, ya que se tiñe al mismo tiempo que las células y "ensucia" la preparación.

ESQUEMA 3 : Ciclo celular según Howard y Pelc (66).

CICLO CELULAR



ESTUDIO DEL CICLO CELULAR



ESQUEMA 4 : Técnica de caracterización del ciclo celular.

— fijan con 2 ml de solución de Bouin durante 2 horas a temperatura ambiente, o bien, 12-24 horas a 4° C. Se decanta el Bouin y se lava el "cubre" con etanol 70-80 %, hasta que desaparezca totalmente el color amarillo. Los "cubres" se dejan dentro de los tubos, en etanol, hasta el momento de ser montados sobre "portas". Para ello se deshidratan con etanol de 95°, 15 minutos, y con etanol absoluto otros 15. Se secan al aire y se montan sobre "porta" con bálsamo del Canadá, dejando las células hacia arriba. Se dejan secar en bandejas, horizontalmente, protegidos del polvo, para ser autorradiografiados.

De los cultivos en suspensión, se tomaron 0,5 ml de 3 tubos cada vez, y se manipulan las células libres en tubos cónicos de centrífuga. Se lavan, como en el caso anterior, con SSS-I, centrifugando 3 minutos a 1.000 x g. La fijación se realiza con Carnoy (ácido acético glacial-etanol absoluto 1 : 3) recién preparado y añadido poco a poco para no deshacer la pella celular. Se tapa el tubo y se deja 20 minutos a temperatura ambiente. Se decanta y se añade 1 ml de Carnoy fresco; 10 o 15 minutos después se resuspende la pella (que está totalmente deshidratada) con pipeta Pasteur, con cuidado de no romper las células *. Se centrifuga a 2.000 x g, 5 minutos y se decanta. Se añade un volumen de Carnoy fresco tal que la suspensión celular quede mas bien concentrada aunque no demasiado. Una vez lograda una suspensión en la que todas las células estén libres, se deja caer una pequeña gota de ésta sobre un "porta" húmedo, con una pipeta Pasteur muy fina. Se dejan secar y se lavan con agua destilada. Así quedan en disposición de ser autorradiografiadas.

Después de reveladas las autorradiografías, se tiñeron las preparaciones con hematoxilina-eosina, y se procedió al recuento de mitosis (metafases concretamente) marcadas y no marcadas en aproximadamente 1.000 ó 1.500 células totales por preparación.

* Las células deshidratadas son muy frágiles y sobre todo las que están en mitosis.

De los varios tipos de distribución estadística: normas (113), logarítmico-normal (8), Tipo III de Pearson(133), etc. que se suelen utilizar para calcular la duración media de las fases del ciclo, se aplicó la distribución logarítmico-normal que dió las mostradas en la Figura 6. A partir de ella, tomando :

$T_{G_2} + 1/2 T_M$ *: como el intervalo de tiempo transcurrido hasta alcanzar el 50% de mitosis marcadas.

T_S : como el valor del tiempo pasado entre los dos primeros puntos consecutivos del 50% de mitosis marcadas.

$T_{G_1} + T_{G_2} + T_M$: como el tiempo comprendido entre el segundo y tercer valor del 50% de mitosis marcadas.

T_C (tiempo del ciclo): el intervalo entre los dos valores homólogos del 50% de mitosis marcadas (el primero y el tercero).(79).

Se obtuvieron los valores de cada fase del ciclo (Tabla 4).

Por una parte, si el porcentaje de células en mitosis es uniforme, la media del número de mitosis (\bar{M}) se puede usar para calcular el valor medio total del ciclo o tiempo de duplicación celular (132) :

$$T_M = T_C \frac{\ln (1+\bar{M})}{\ln 2}$$

TABLA - 4 - Ciclo celular de CAEL. Duración aproximada en horas de cada fase **.				
T_{G_1}	T_S	T_{G_2}	T_M	T_C
9,7	7,0	5,1	2,7	24,5

* La mitad de la mitosis es generalmente la duración de la profase.

** Valor medio del número de mitosis : 0,0808.

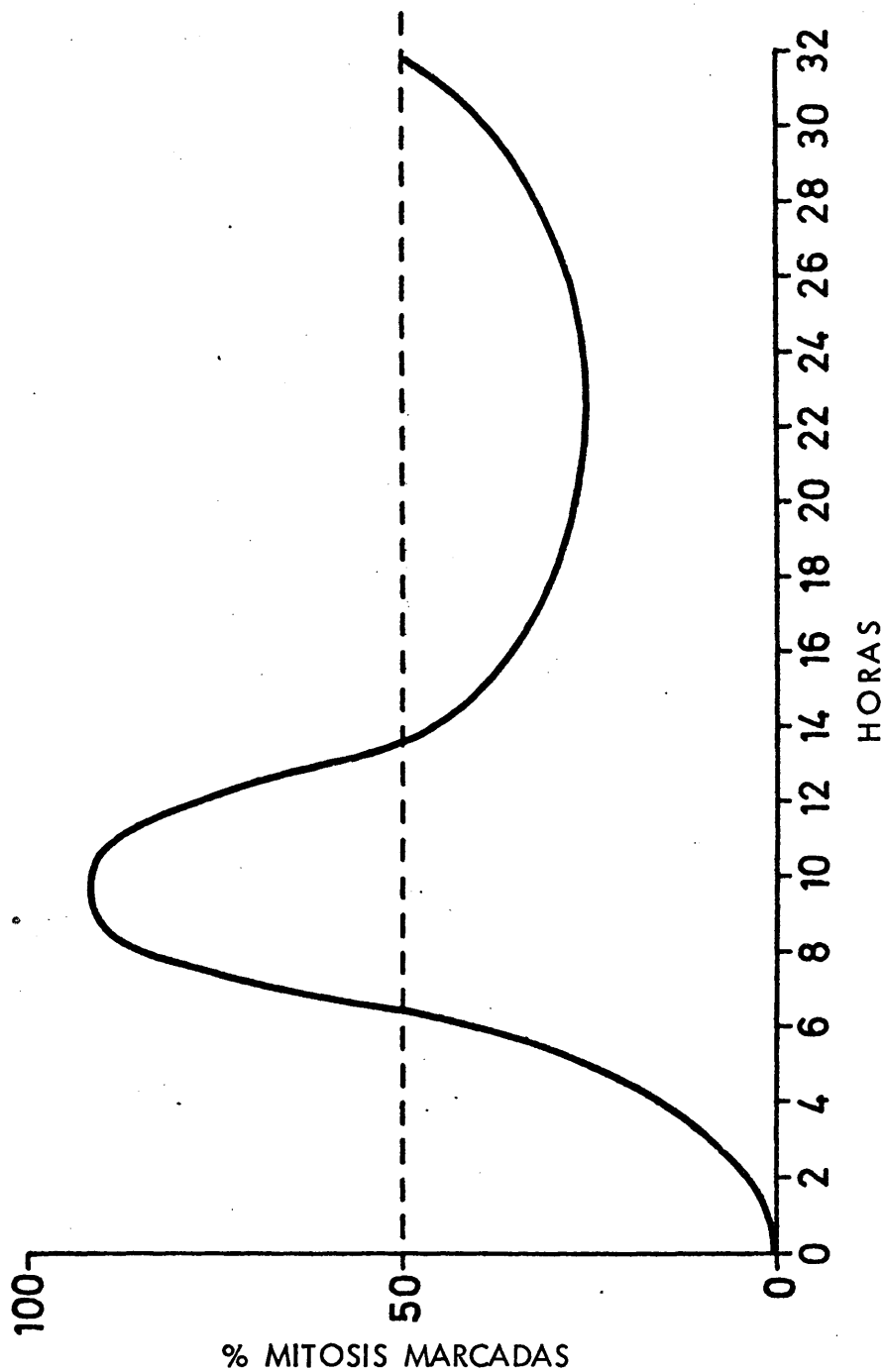


FIGURA 6.- Ciclo celular de CAEL "in vitro". Cultivos en suspensión en medio B + 20% de s.t. Estudio realizado según la técnica descrita en el texto y resumida en el Esquema 4. De la figura se deducen: $T_S = 7$ h; $T_{G_2} + \frac{1}{2} T_M = 6,5$ h; $T_M + T_{G_1} + T_{G_2} \approx 17,5$ h; $T_C \approx 24,5$ h.

IV.4.- SINCRONIZACION de CAEL "IN VITRO" en FASE de SINTESIS de DNA.

De todos los sistemas ensayados en el Departamento, y buscando siempre que el proceso no altere el posterior comportamiento celular, se eligió el de cultivo en exceso de timidina (TdR) realizado por vez primera por Xeros (141).

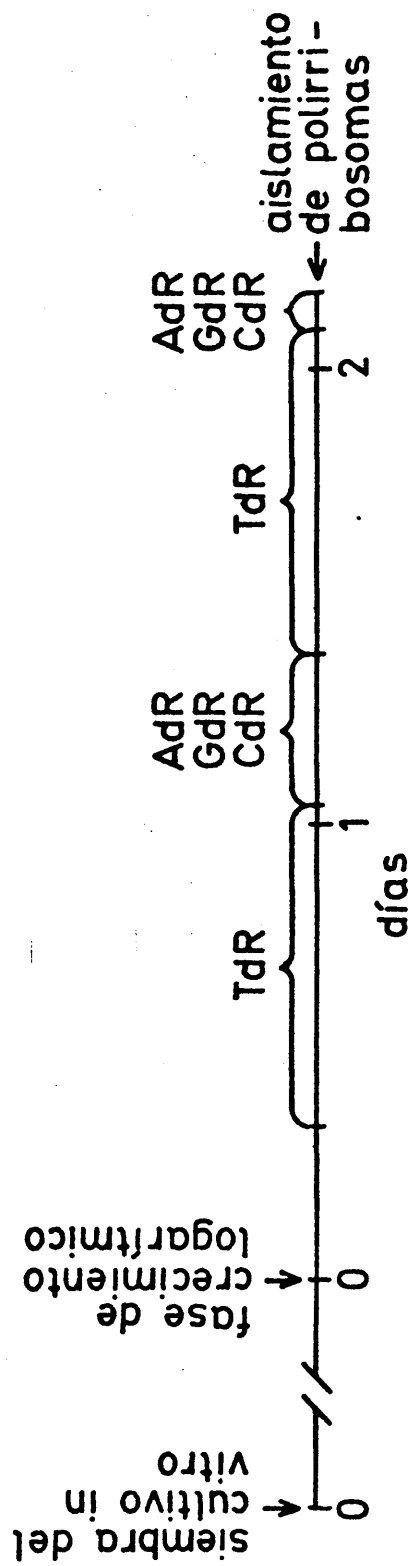
Para sincronizar las células CAEL "in vitro" se usó la técnica del doble tratamiento con exceso de timidina, como se describe a continuación. En fase logarítmica de crecimiento se separaron las células del medio por centrifugación a $80 \times g$, y se resuspendieron en otro, conteniendo 500 mg/ml de TdR. Se incubaron durante 17 horas *, al final de las cuales se lavó abundantemente el cultivo con SSS-I y se resuspendió en medio suplementado con AdR — (2,5 mg/ml), CdR (2,3 mg/ml) y GdR (2,7 mg/ml), para ser incubado durante 8 horas **. Nuevo lavado, y se procedió al segundo choque con igual cantidad de TdR que en el primero y de la misma duración. Se lavó y se incubó durante una hora en el medio suplementado con AdR, CdR y GdR (Esquema 5).

Para comprobar el grado de sincronización se tomaron tres tubos a los que se dió un pulso de 20 minutos con TdR-metil $[^3H]$ ($3 \mu Ci/ml$ concentración final), al mismo tiempo que a un tubo control no tratado con TdR. Se lavaron con solución de TdR fría de $1 \mu g/ml$ en SSS-I, y se fijaron con Carnoy según el mismo proceso empleado en el ciclo celular. Se hicieron preparaciones — sobre "portá" húmedo, como se ha descrito en el apartado IV.3.2.2.), se autorradiografiaron, y se tiñieron con hematoxilina-eosina para proceder, a continuación, a la tabulación de células marcadas y no marcadas isotópicamente. El resultado fué de un 80 % aproximadamente de células en fase S.

* Este periodo de tiempo es igual a la duración del ciclo menos la mitad de la fase de síntesis de DNA. ($T_C - 1/2 T_S$).

** Duración de la fase S.

Sincronización con doble choque de TdR



ESQUEMA 5 : Técnica de sincronización de la población celular en fase de síntesis DNA.

IV.5.- AISLAMIENTO de POLIRRIBOSOMAS.

IV.5.1.- Introducción.

En este apartado se describirán los métodos utilizados para obtener polirribosomas a partir de las diferentes líneas celulares, en los que se han tenido en cuenta varios factores que afectan fundamentalmente a la estructura nativa del biopolímero. Todas las operaciones que constituyen esta parte experimental están condicionadas por la circunstancia de que el aspecto que se ha querido estudiar es principalmente el funcional en el interior de la célula, observando la estructura y la actividad bioquímica que muestran las macromoléculas una vez separadas de su entorno. Este hecho impone la elección de métodos de aislamiento que conserven y mantengan inalterada dicha estructura.

Se han considerado varios aspectos importantes antes de hacer esta selección:

- 1)Cuál es la riqueza en membranas de retículo endoplásmico de las células utilizadas, y si los ribosomas se encuentran ligados a ellas.
- 2) Los niveles de RNAsas que éstas células contienen.
- 3) Que el proceso en general sea de manipulación rápida.
- 4) Que las condiciones de rotura de la membrana citoplásmica sean adecuadas, es decir, que no afecten al resto de los componentes celulares.
- 5) La fuerza iónica y el pH de las soluciones salinas empleadas.

En la bibliografía se hallaron algunos métodos que reunían un buen número de las condiciones exigidas. Pero era necesario estudiar detenidamente sobre todo aquellas partes del proceso que más influyen en los resultados obtenidos, para adecuarlas totalmente a nuestras propias condiciones, tanto de material biológico, como de elementos auxiliares.

Por otra parte, el trabajar con dos tipos celulares muy distintos entre sí, obligó a introducir modificaciones específicas dentro del esquema general establecido de aislamiento.

IV.5.2.- Directrices seguidas en los distintos aislamientos de polirribosomas.

1) Las células se han tomado siempre en fase logarítmica de crecimiento, y se han lavado con SSS-I suplementada con vitaminas.

2) En todos los casos, la actividad del sistema polirribosómico se determinó marcando isotópicamente los polipéptidos nacientes con pulsos cortos (entre 3 y 5 minutos) de hidrolizado proteico $[^{14}\text{C}]$, deteniéndose la incorporación por adición de 4 volúmenes de granizado del buffer en que se hará el aislamiento.

A partir de aquí, la técnica se realiza totalmente a 0°C , siendo, por supuesto, muy importante esta condición.

3) Obtención de células cancerosas a partir de CAE "in vivo" eliminando las células sanguíneas. Se ensayan dos técnicas :

- a) Centrifugación en gradiente discontinuo de Ficoll.
- b) Lavados sucesivos en PBS (Tabla 5) centrifugando a baja velocidad.

Una vez seleccionadas, se resuspenden en SSS-I a 0°C , y se recuentan en cámara de Neubauer.

4) A continuación se procedió a lisar lo más suavemente posible la membrana citoplásmica. Para ello se estudió la acción de dos métodos generales:

- a) Homogeneización en buffer hipotómico
- b) Lisis con detergente no iónico Triton X-100

5) El crudo celular se purificó por centrifugación diferencial. Si procedía de homogeneización mecánica, se sometía 3 a 5 minutos a 700 x g para eliminar células enteras, núcleos, etc., y el sobrenadante, 10 minutos a 10.000 x g, recogiendo el sobrenadante postmitocondrial. Si procedía - de lisis química, la centrifugación fué de 5 minutos a 700 x g únicamente.

En algunos casos el sobrenadante postmitocondrial se sometió directamente, sin más purificaciones, a centrifugación en gradiente lineal de sacarosa para estudiar la distribución de los polisomas según sus pesos moleculares.

5-a) En otros casos, con el fin de diferenciar los polisomas que se encuentran libres en el citoplasma, de los unidos al retículo endoplásmico rugoso, se trató una parte del sobrenadante postmitocondrial con Triton X-100 (1,0% concentración final) en buffer isotómico, durante 5 a 10 minutos para - liberar los polisomas ligados a membranas. El resto se llevó a concentración salina isotónica.

5-b) Ambas soluciones se centrifugaron simultáneamente a través de gradientes discontinuos de sacarosa (1,6 M/2,0 M), 18 horas a 120.000 x g y 4° C.

5-c) Las pellas de polirribosomas así obtenidas, una conteniendo todos los polirribosomas citoplásmicos de la célula, y la otra con solo los libres, se resuspendieron cuidadosamente en el buffer isotónico, en el que se ha preparado el gradiente discontinuo; después de eliminar los agregados inespecíficos que se hubiesen formado centrifugando a 3000 x g, se ajustó, siempre que fué posible, la concentración del sobrenadante a 25 ó 30 u.o./ml de absorción a 260 nm.

6) En todos los casos, las suspensiones polirribosómicas se sometieron a ultracentrifugación en gradiente lineal de sacarosa de 15 al 30% (p/p) (en el mismo buffer de los aislamientos o de las purificaciones, según los casos).

Se coloca 1 ml de la suspensión polisómica sobre un gradiente lineal de 27 ml, y se centrifuga a 4°C, 2 horas a 25.000 rpm en rotor SB-110 de ultracentrífuga B-60 de I.E.C. (equivalentes a 110.000 x g).

7) Los gradientes se fraccionaron en alícuotas de 1 ó 0,5 ml, según los casos, introduciendo un capilar hasta el fondo del tubo, y succionando ligeramente por el extremo libre, alargado con una fina cánula de plástico, para conseguir la salida del líquido y recoger el goteo en tubos aforados.

La localización de polirribosomas se realizó en todos los casos por registro de D.O. a 260 y 280 nm de cada fracción; por su parte, la actividad de biosíntesis fué determinada por recuento directo de ^{14}C sobre filtros GF/C de Whatman mediante espectrometría de centelleo líquido.

La pendiente del gradiente de densidad de sacarosa se determinó por refractometría.

Los coeficientes de sedimentación no se estimaron por introducción de partículas de referencia, sino por cálculo a partir de las tablas y expresiones propuestas por McEwen (87).*

Estos resultados fueron siempre confirmados por la microscopía electrónica.

Los gradientes se prepararon 18 horas antes de ser utilizados, dejando difundir a 4°C, 6 fases de 4,5 ml (excepto la de 30% que es de 5 ml) de soluciones de sacarosa del 30, 27, 24, 21, 18 y 15% (p/p) respectivamente, preparadas en el buffer que se indicará. El gradiente, así preparado, es perfectamente lineal y reproducible como se comprobó repetidas veces.

* Los coeficientes de sedimentación calculados de esta manera no tienen valor absoluto, pero si son internamente coherentes y equivalentes a los determinados en ultracentrífuga analítica.

IV.5.3.- Marcado isotópico de polipéptidos nacientes.

Se parte en todos los casos de solución de hidrolizado proteico $\left[^{14}\text{C}\right]$ de 57 $\mu\text{Ci}/\text{m Atomo C}$ diluída con SSS-I más vitaminas hasta 30 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ y mantenida en condiciones de esterilidad a 4°C .

Las células mantenidas "in vivo", inmediatamente después del avenado, se lavaron con SSS-I suplementada con vitaminas * y a 37°C .

La pella celular se resuspende en un volumen de SSS-I más vitaminas igual al avenado, y se añade solución marcadora hasta 3 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de concentración final. La suspensión resultante tiene una densidad celular de aproximadamente 100 a 150×10^6 células/ml.

Se incuba 3 minutos en baño a 37°C con agitación suave y se detiene la reacción vertiendo la suspensión sobre 4 ó 5 veces su volumen de PBS (Tabla 5) granizado, SSS-I o bujjer de aislamiento, según cual de las tres soluciones salinas haya de ser utilizada a continuación.

Con las células mantenidas "in vitro" se siguió el mismo proceso aunque fué necesario aumentar la dosis a 30 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ en una suspensión de 50×10^6 células/ml, (es decir, 20 veces la concentración utilizada "in vivo"), y el tiempo de incubación a 5 minutos. Aquí el marcado se realizó en medio de cultivo diluido 20 veces con SSS-I

TABLA - 5 - Solución PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} . Composición en g/l.	
NaCl	8,0
KCl	0,2
$\text{Na}_2\text{PO}_4\text{ H}$	1,15
$\text{KPO}_4\text{ H}_2$	0,2

- * Se adiciona la misma cantidad de vitaminas que al medio B (Tabla 3) para que las células estén el menor tiempo posible sin nutrientes y a 37°C , condiciones en las que se degradan rápidamente los polirribosomas (5 y 63).

IV.5.4.- Selección de células cancerosas de tumor ascítico-hemorrágico de Ehrlich (CAE).

Como ya dijimos, uno de los tumores ascíticos de Ehrlich que se utilizan en este trabajo (el denominado CAE "in vivo"), produce lesiones hemorrágica en el peritoneo, por lo que las células cancerosas se obtienen mezcladas con gran cantidad de células sanguíneas. Para eliminar estas últimas se ensayaron dos métodos :

- a) Centrifugación en gradiente discontinuo de Ficoll.
- b) Centrifugación a pequeña velocidad en solución salina.

Ambos se basan en la notable diferencia de densidad y tamaño existentes entre las células cancerosas y las sanguíneas : las células cancerosas ascíticas tienen una densidad aproximada de 1,071 g/ml con un diámetro de 30 μ m y las células sanguíneas (eritrocitos en su mayor parte) una densidad de 1,093 g/ml con un diámetro de 6 μ m (111).

a) Centrifugando la mezcla celular procedente del avenado en un gradiente discontinuo de Ficoll de 8 ml de solución al 21,5% (p/p) (ρ = 1,080 g/ml), 8 ml al 20,5% (p/p) (ρ = 1,075 g/ml) y 5 ml de solución salina PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , 50 minutos a 650 x g y 4°C, se obtiene una perfecta separación; los eritrocitos quedan sedimentados o en la fase más densa, mientras las células ascíticas quedan en la interfase solución salina-Ficoll 20,5%. De ahí se recogen fácilmente con una pipeta, y se lavan con SSS-I hasta eliminar totalmente el Ficoll.

Coincidiendo con los datos bibliográficos, la viabilidad posterior de las células es normal (110), siendo ventajoso el empleo de Ficoll sobre la sacarosa.

b) En el segundo método, las células una vez lavadas, se resuspenden en 5 volúmenes de PBS a 0°C y se centrifugan en tubo de fondo cónico a 20 x g, 3 minutos. Las células tumorales se sedimentan ligeramente quedando

las células rojas en el sobrenadante que se retira con pipeta. Repitiendo tres veces el proceso, se consigue eliminar casi totalmente los eritrocitos.

Las células, lavadas con SSS-I, se contaron, y se comprobó la mortalidad - producida por ambos métodos.

En la tabla 6 se muestran el porcentaje de recuperación celular, el rendimiento y la viabilidad obtenidos, así como el tiempo empleado

TABLA - 6 - Selección de células cancerosas a partir de CAE "in vivo".				
	% de células recuperadas	% de células cancerosas	Mortalidad (% de células muertas)	Tiempo
Centrifugación en gradiente de Ficoll	90%	97%	6%	90'
Centrifugación en PBS a 20 x g	60%	90%	1,5%	30'

Con la centrifugación en gradiente de Ficoll se obtiene una contaminación - mínima (el 3%), una buena recuperación celular total, pero la mortalidad es algo mayor y es un proceso excesivamente largo. Durante ese período las células se encuentran en un medio sin protección de membrana y sin nutrientes, por lo que es muy conveniente que sea lo más corto posible *.

* Incubando células de mamífero en solución salina sin aminoácidos durante 30 minutos, se producen pérdidas de polisomas con aumento de ribosomas libres (5 y 63).

Aunque en los resultados experimentales de aislamientos realizados en este trabajo no se aprecia una influencia clara de estos procesos, (sobre todo parece que no se produce destrucción polisómica a causa de la centrifugación en gradiente de Ficoll), se siguió preferentemente el de centrifugaciones a bajas velocidades.

IV.5.5.- Lisis de la membrana citoplásmica.

Los métodos de lisis celular y subsecuente centrifugación diferencial son muy diferentes para células con ribosomas unidos a membranas, que los aplicables a las que los tienen libres en el citoplasma.

Como ya hemos dicho, es una de los tres factores que más afectan al proceso. Teniendo en cuenta la acción de las RNasas y la fragilidad de la estructura del biopolímero, así como nuestro deseo de obtener separadamente polirribosomas libres en el citoplasma y unidos a retículo endoplásmico, se estudiaron dos sistemas de lisis :

- 1) Homogeneización en buffer hipotónico
- 2) Detergente no iónico.

IV.5.5.1.- Homogeneización suave en buffer hipotónico.

Cada línea celular utilizada presenta diferente resistencia a nivel de membrana citoplásmica, por lo que fué necesario ensayar previamente los tiempos de hipotonización así como la intensidad de la homogeneización. Se realizó también una cinética en buffer isotónico (BI-1 : Tris - HCl 0,01 M, pH 7,5; NaCl 0,14 M y $MgCl_2$ 0,02 M). Los buffers hipotónicos comparados fueron :

BH-1 : Tris-HCl	0,01	M	pH 7,5
KCl	0,01	M	
Mg $(CH_3 - COO)_2$	0,0015	M	

BH-2 : Tris-HCl	0,020 M	pH 7,5
KCl	0,025 M	
Mg(CH ₃ -COO) ₂	0,002 M	
β -mercaptoetanol	0,006 M	

En todos los casos las células se llevaron a $40 \text{ ó } 50 \times 10^6/\text{ml}$.

Se utilizó un homogeneizador de Pierce et al. (109) vidrio-vidrio o vidrio-teflon, según se indicará en los resultados, de 0,51 mm de luz, (equivalente a 0,02 pulgadas), de Tri-R-Instruments, movido manualmente o con motor Inc.K-41.

Las cinéticas se siguieron al microscopio óptico (tiñendo con violeta cristal*), y se eligió, en cada caso, una rotura de alrededor del 80 % de las células, que era la que conseguía mayor número de células rotas, sin que se afectasen los núcleos.

IV.5.5.2.- Lisis con detergente no iónico.

Se eligió Triton X-100, y se hicieron cinéticas con dos buffers de distinta fuerza iónica -ya que ésta juega un papel fundamental en el aislamiento (48 y 147)-, ambos isotónicos. También se buscó la concentración de Triton X-100 mas adecuada para cada caso.

Los buffers ensayados fueron:

BI-3 : Tris-HCl	0,020 M	pH 7,7
KCl	0,150 M	
Mg(CH ₃ -COO) ₂	0,005 M	
β -mercaptoetanol	0,006 M	

* Violeta cristal 0,1 g

Ac. Cítrico 1,92 g

H₂O c.s.p. 100 ml

Tiñe de azul intenso los núcleos y más pálido los citoplasmas.

y de menor fuerza iónica :

BI-2 : Tris-HCl	0,020 M	pH 7,7
KCl	0,025 M	
Mg(CH ₃ -COO) ₂	0,002 M	
Sacarosa	0,25 M	
β -mercaptoetanol ..	0,006 M	

Se esterilizan por ultrafiltración y se guardan a 4°C.

Se prepararon soluciones al 10% de Triton X-100 en ambos buffers * .

La pella celular lavada se resuspende en buffer hasta concentración final de 50×10^6 células/ml.

Se añadió la solución correspondiente de Triton X-100, hasta concentración final de 0,5% ó de 0,1% (93 y 96) según los casos. Se pipeteó suavemente y se dejó a 0°C, tomándose muestras para observación con microscopio óptico.

Los resultados obtenidos se verán en el capítulo correspondiente (V.1.2.), en el que se hace el estudio de cómo afecta la fuerza iónica.

IV.5.6.- Polisomas libres y ligados a membranas.

La mitad del sobrenadante postmitocondrial obtenido por homogeneización, fué tratado de 5 a 10 minutos con una décima parte de su volumen de Triton X-100 al 10% en buffer BI-4 [10 x] (concentración final 1,0% correspondiente a buffer isotónico, [1 x]) al mismo tiempo que la otra mitad se hacía isotónica por adición también del mismo buffer BI-4 [10 x] .

* Estas soluciones no contenían β -mercaptoetanol.

BI-4 : KCl 0,15 M
 Mg(CH₃-COO)₂ 0,01 M
 Trietanolamina 0,01 M pH 7,5
 β-Mercaptoetanol ... 0,006 M

A continuación, 4 ml de cada sistema se colocaron sobre sendos gradientes discontinuos de sacarosa consistentes en 2 ml de solución 2 M y 3 ml de solución 1,6 M, preparados en el mismo BI-4. Se centrifugaron 18 horas a - 37.000 rpm, y 4°C en rotor A-321 de ultracentrífuga I.E.C., modelo B-60 (120.000 x g).

En el no tratado con detergente se obtuvieron al final de la fase 1,6 M dos bandas densas debidas a los polirribosomas ligados a membranas. Quedaban de este modo separados de los libres, los cuales son capaces de sedimentar, a través de la fase 2 M, en una pella en el fondo del tubo. En el tratado de Tritón X-100 estas bandas no aparecen, o son muy tenues, ya que los polisomas han sido desprendidos de las membranas y sedimentan en su totalidad en el fondo del tubo.

Se recogieron por separado todas las fases para ser estudiadas como se mostrará en el apartado correspondiente. (VI.1.1.1.).

Las pellas se resuspendieron en el menor volumen posible de BI-4, y los agregados inespecíficos se eliminaron por centrifugación (10 minutos a 3.000 x g). Como se ha indicado en el esquema general, 1 ml de este sobrenadante, conteniendo 20-30 u.o., se colocó sobre gradiente lineal de sacarosa del 15 al 30% (p/p) para separar las partículas que se encuentran en suspensión en dicho sobrenadante, según sus coeficientes de sedimentación.

R E S U L T A D O S

V.- INFLUENCIA de las CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Cómo hemos visto en los Capítulos II y III de esta Memoria, para estudiar la actividad polirribosómica, hay que considerar un buen número de factores que inciden en ella.

Una vez analizados éstos desde un punto de vista teórico, se proyectaron unas técnicas concretas. Necesariamente había que comprobar de forma experimental cómo afectaban a los resultados obtenidos los factores ya mencionados.

V.1.- TIPO de LISIS.

El sistema de lisis de la membrana citoplásmica es uno de los factores más importantes en la obtención de polisomas; influye decisivamente sobre los resultados, como hemos expuesto en el apartado III.2. de este trabajo. Por ello se experimentaron las dos técnicas elegidas teóricamente como más adecuadas, aplicándolas a las células cancerosas, y se analizaron diversos aspectos.

Las dos técnicas elegidas son :

- 1) Lisis mecánica por homogeneización
- 2) Lisis química por solubilización parcial de la membrana con detergente no iónico.

Vamos a ver los resultados obtenidos con cada una de ellas.

V.1.1.- Homogeneización.

El estudio se realizó en células ascíticas de los dos tipos de tumores manejados, por ser más fácil su mantenimiento y porque se observó que, tanto las CAEL como las CAE, presentan una membrana citoplásmica muy resistente, lo que hacía un tanto problemático alcanzar un rendimiento máximo con un mínimo de alteración de la estructura polirribosómica. Buscando ese equilibrio, se conjugaron cuatro factores: densidad de población celular, tiempo de hipotonización, fuerza de cizalla y tiempo de aplicación de la misma.

Se emplearon dos tipos de homogeneizadores: vidrio-vidrio y vidrio-teflon, ambos de 0,5 mm de luz (equivalente a 0,02 pulgadas).

En unos casos la homogeneización se realizó manualmente controlando el número de emboladas, en otros con el motor Inc.K-41 a distintas velocidades, controlando el tiempo.

Las cinéticas se siguieron en una primera aproximación por recuento de células enteras y rotas, hasta la aparición de restos nucleares, tiñiendo con violeta cristal.

Vamos a ver los resultados que se obtuvieron en las diferentes condiciones.

V.1.1.1.- Homogeneizador vidrio-vidrio.(Efecto de la con tración salina).

Algunos autores consultados a los que nos hemos referido en el apartado - III.2.3.1. de esta Memoria, señalan que aunque las soluciones hipotónicas faciliten la homogeneización, es preferible romper las células en medio isotónico o ligeramente hipertónico para evitar roturas de mitocondrias y lisosomas (3, 5, 17 y 108).

Buffer BI-1 :

Con células CAE "in vivo" nosotros ensayamos el buffer isotónico BI-1 (ver Tabla 7) y dos pH diferentes : 7,4 y 8,5 respectivamente. Se tomaron muestras de 50, 100, 150 y 200×10^6 células/ml. La homogeneización se hizo a 0°C , con homogeneizador vidrio-vidrio y manualmente.

No se vió una diferencia significativa entre los resultados obtenidos a cada pH.

Las muestras de densidad celular baja (50×10^6 células/ml) y muy alta (200×10^6 células/ml) dieron cambios bruscos a lo largo de la cinética. Los resultados eran poco homogéneos.

Las muestras de 100 y 150×10^6 células/ml sufrieron el proceso más linealmente. Hasta las 35 emboladas, la cantidad de células enteras es superior al 50% del total, aunque, a partir de ese momento, los núcleos de las células ya rotas aparecen sin citoplasma adherido a ellos. A las 55 emboladas permanecen enteras del 30 al 40% de las células y, sin embargo, se pueden ver ya algunos restos nucleares.

Luego la homogeneización en estas condiciones resulta de bajo rendimiento, y es posible que demasiado enérgica, por lo que se podrían alterar las estructuras polirribosómicas de alto peso molecular.

Por otra parte, una gran mayoría de los aislamientos de polirribosomas realizados a partir de muy diferentes tejidos y líneas celulares, se hacen homogeneizando en medio hipotónico tomando las debidas precauciones frente a las RNAsas que posiblemente se liberen (13, 63, 64 y 96).

Buffer BH-1 :

Se ensayaron con buffer BH-1 (Tabla 7) las mismas condiciones que con el BI-1 a tres tiempos de hipotonización previa : 5, 7 y 10 minutos Este último

TABLA - 7 - BUFFERS utilizados en este Trabajo.

I.- Buffers hipotónicos :

BH-1.-	Tris-HCl	0,010 M	(pH 7,5)
	KCl	0,010 M	
	Mg (CH ₃ COO) ₂	0,0015 M	
BH-2.-	Tris-HCl	0,020 M	(pH 7,5)
	KCl	0,025 M	
	Mg (CH ₃ COO) ₂	0,002 M	
	β -mercaptoetanol	0,006 M	

II.- Buffers isotónicos :

BI-1.-	Tris-HCl	0,01 M	(pH 7,5)
	NaCl	0,14 M	
	MgCl ₂	0,02 M	
BI-2.-	Tris-HCl	0,020 M	(pH 7,5)
	KCl	0,025 M	
	Mg (CH ₃ COO) ₂	0,002 M	
	β -mercaptoetanol	0,006 M	
	Sacarosa	0,25 M	
BI-3.-	Tris-HCl	0,02 M	(pH 7,5)
	KCl	0,15 M	
	Mg (CH ₃ COO) ₂	0,005 M	
	β -mercaptoetanol	0,006 M	

TABLA - 7 - (Continuación)

BI-4.-	Trietanolamina	0,01 M	(pH 7,5)
	KCl	0,15 M	
	Mg (CH ₃ COO) ₂	0,01 M	
	β -mercaptoetanol	0,006 M	

III.- Buffer de elevada fuerza iónica :

BI-5.-	Tris-HCl	0,020 M	(pH 7,7)
	KCl	0,300 M	
	Mg (CH ₃ COO) ₂	0,010 M	
	β -mercaptoetanol	0,006 M	

tiempo dió como resultado comparativo respecto de los otros dos un mayor rendimiento (80% de células rotas) en menor tiempo (20 emboladas) sin que apareciesen núcleos dañados.

Estos resultados eran ventajosos también respecto a los obtenidos con BI-1, por lo que se adoptaron sus condiciones para estudiar el aislamiento de polisomas.

En la figura 7 se han representado los perfiles polirribosómicos obtenidos a lo largo de una cinética de homogeneización en BH-1. Claramente se aprecia una variación, tanto en la cantidad de material obtenido, como en los pesos moleculares correspondientes a ese material.

Con 30 emboladas se obtiene un pico pequeño (0,3 u.o./ml) correspondiente a monómeros*, sin que apenas aparezcan polirribosomas.

Continuando la homogeneización hasta 37 golpes de pistón, se obtiene un pico agudo de 0,77 u.o./ml en el máximo, y un notable aumento en la zona de los polirribosomas con un máximo en la fracción 7 de 0,39 u.o./ml.

A las 40 emboladas, el pico de los monómeros se hace mas ancho y de menor altura (0,55 u.o./ml), lo que puede indicar una cierta mezcla de partículas de pesos moleculares próximos (dímeros y monómeros probablemente). En cuanto a los polirribosomas, aparecen en cantidad ligeramente mayor que en el caso anterior, y con el máximo desplazado a la fracción 4.

* Todavía no se puede determinar con claridad si son sólo monómeros o hay también dímeros. De momento nos referiremos a esa zona como zona de monómeros sencillamente, para distinguirla del resto en que se encuentran los polisomas de coeficientes de sedimentación mayores.

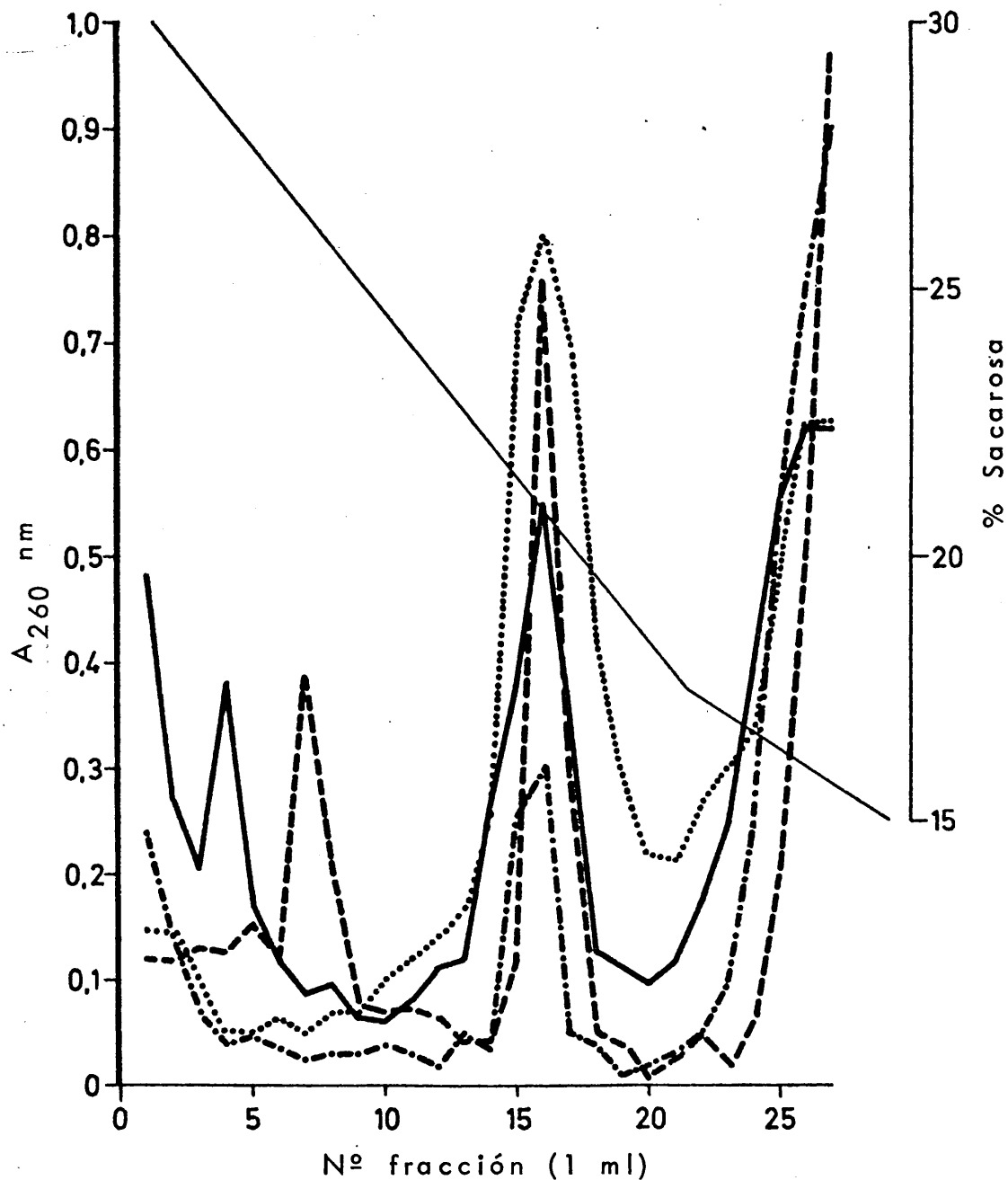


FIGURA 7.- Perfiles polisómicos obtenidos a lo largo de una cinética de homogeneización en BH-1. Células CAE "in vivo". Separación de células sanguíneas con gradiente discontinuo de Ficoll (20/21%) en PBS. Choque hipotónico de 10 minutos en BH-1 con una densidad de 100×10^6 células/ml. Homogeneización manual con émbolo de vidrio. El crudo celular se purifica por centrifugación a $650 \times g$ y $10.000 \times g$ y los respectivos spm se sedimentan a través de gradientes lineales de sacarosa del 15-30%, 1,5 h a $100.000 \times g$ en rotor A-147 de ultracentrífuga I.E.C., modelo B-60. Se fraccionan en alícuotas de 1 ml y se registra la D.O. a 260 nm y el índice de refracción de cada fracción. 30 emboladas -.-.-; 37 emboladas ---; 40 emboladas; 50 emboladas _____.

Por último, con 50 emboladas se obtiene un solo pico muy ancho (abarca desde la fracción 12 a la 21), con el máximo en la fracción 16 y de 0,8 u.o./ml. Es decir, los polisomas se han degradado hacia partículas de pesos moleculares más bajos, y las bandas del gradiente quedan mezcladas o solapadas las unas por las otras.

La Tabla 8 nos permite comparar las cantidades relativas de polisomas y ribosomas obtenidos en cada punto.

TABLA - 8 - Cinética de homogeneización manual en BH-1 Células CAE "in vivo".		
Emboladas	Análisis del gradiente lineal. Rotor A-147	
	Monosomas %	Polisomas %
30	48,1	51,9
37	44,3	55,7
40	44,6	55,4
50	72,5	27,5

Es decir, con 30 emboladas, una parte de los polirribosomas se pierde* en las centrifugaciones diferenciales; es muy posible que se encuentren en la zona citoplásmica más próxima al núcleo que tiene una mayor densidad y tarda más en solubilizarse. Por otra parte, esta zona presenta una mayor riqueza ribosómica en comparación con el resto del citoplasma.

* No se puede pensar en desnaturalización, ya que al aumentar el número de emboladas a 37, aumenta también el de polisomas.

Con 37-40 emboladas se consigue una cantidad apreciable de polirribosomas, aunque con poca diferenciación según pesos moleculares. Al continuar la homogeneización, se ve claramente una degradación de los polirribosomas de pesos moleculares altos a otros más pequeños.

También puede suceder que se estén rompiendo ya las estructuras polirribosómicas desde las 37 o 40 emboladas, o bien se haya liberado una cantidad de RNAsas capaz de degradarlos.

Por otra parte, resulta un poco sorprendente tan poca cantidad de polirribosomas (sólo un 55% en el máximo valor). Para aclarar este punto, se marcaron los polipéptidos nacientes con $3 \mu\text{Ci/ml}$ de hidrolizado proteico $[^{14}\text{C}]$ durante 3 minutos, inmediatamente después de avenar las células. A continuación, se procedió a la centrifugación en gradiente de Ficoll, y se continuó como en los experimentos anteriores dando 40 emboladas.

La pella procedente de la centrifugación a $650 \times g$ (pella de células enteras y núcleos) tiene un volumen grande, es decir, los restos celulares de gran tamaño son abundantes. Después de la centrifugación a $10.000 \times g$, el sobrenadante postmitocondrial se dividió en dos partes iguales para ser centrifugado en dos gradientes simultáneamente.

Los resultados obtenidos al fraccionar los gradientes, se muestran en las figuras 8 y 9. En ambas aparece un pico agudo de D.O. con el máximo en la fracción 16, y de 1,52 y 1,20 u.o./ml respectivamente.

Las subunidades ribosómicas se encuentran en las fracciones 20, 21 y 22, quedando solapadas en parte por el material de bajo peso molecular, que ha sedimentado desde la carga del gradiente.

En la zona correspondiente a polirribosomas (fracciones 1 a 14), se aprecian 3 picos, de poca altura y no muy nítidamente separados.

Por otra parte, ambos perfiles son perfectamente superponibles.

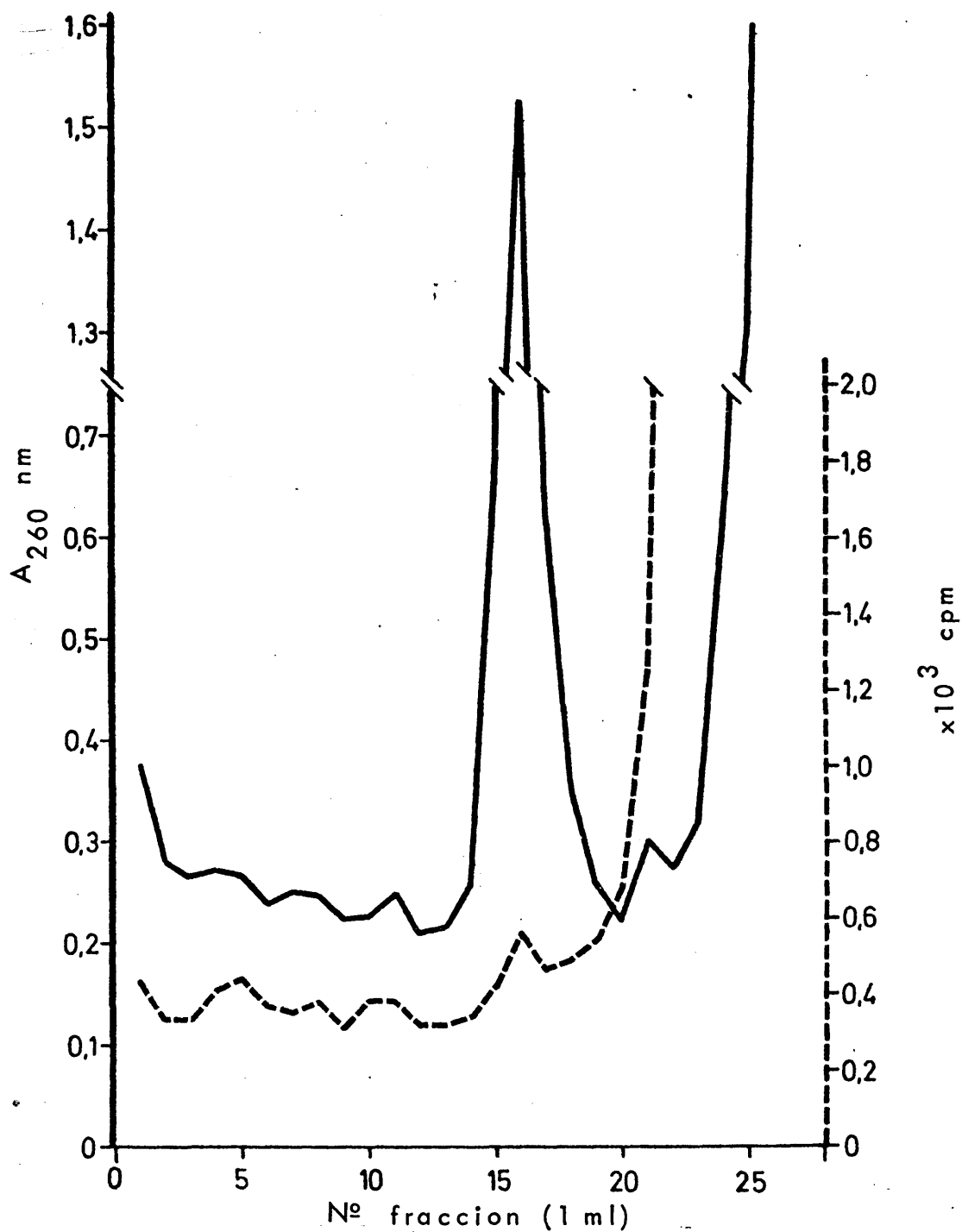


Fig. 8

FIGURAS 8 y 9.- Homogeneización manual en BH-1 con émbolo de vidrio (40 emboladas). Células CAE "in vivo". Inmediatamente después de avemar el tumor se da un pulso de 3 minutos con $3 \mu\text{Ci/ml}$ de hidrolizado proteico [^{14}C] manteniendo la misma densidad celular que tenía el tumor (200×10^6 células/ml).

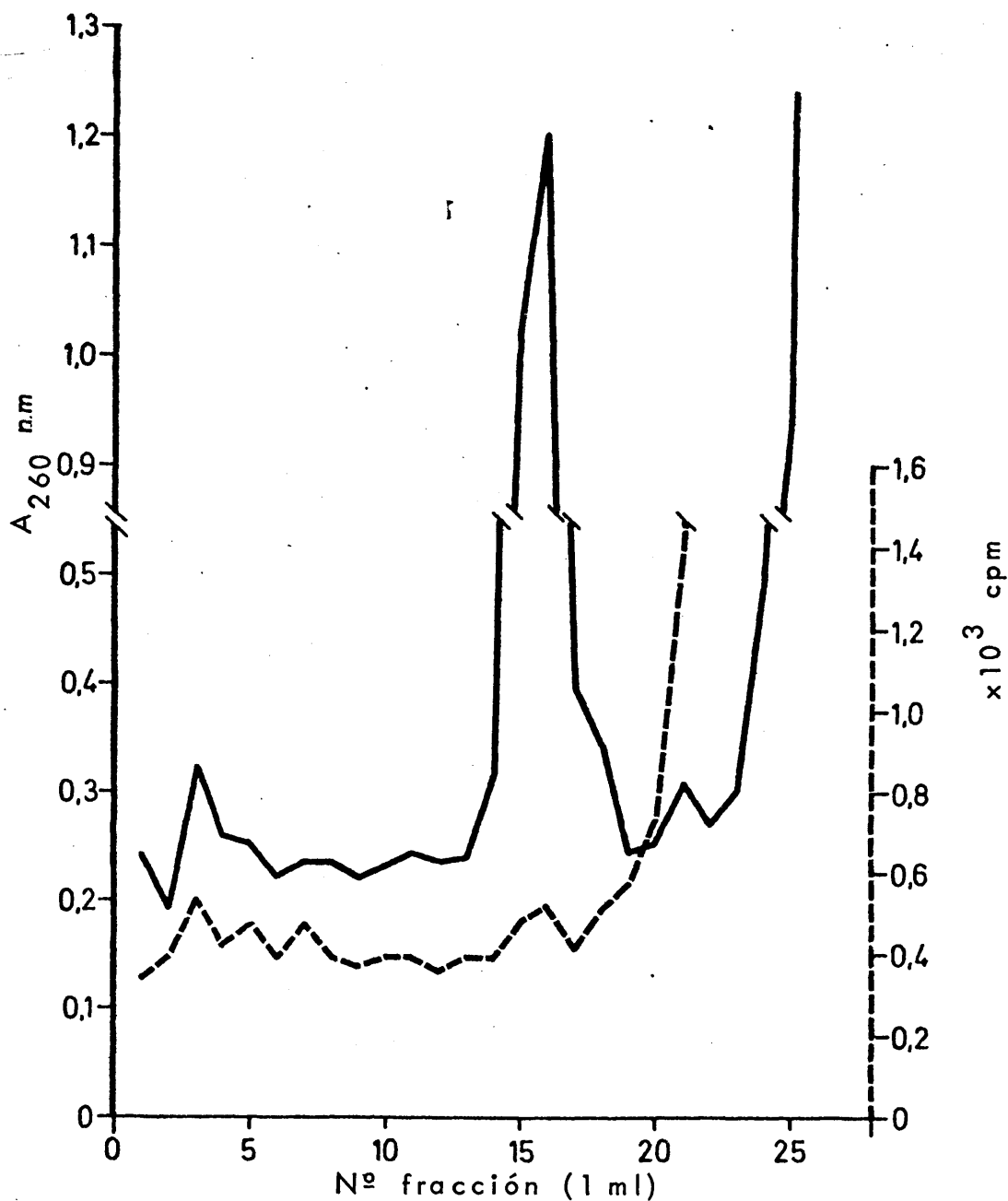


Fig. 9

FIGURAS 8 y 9.- (Continuación)

Se eliminan las células de la sangre centrifugando a través de gradiente discontinuo de Ficoll y se continúa como se ha descrito en la figura 7, dando 40 emboladas. El spm se divide en dos partes iguales y se centrifuga, 1,5 horas a 100.000 x g en rotor A-147, en dos gradientes lineales de sacarosa (15-30%) simultáneamente. Los perfiles obtenidos a partir de cada uno de ellos, fraccionándolos en alícuotas de 1 ml y registrando la D.O. y las cpm, son los mostrados en estas dos figuras 8 y 9.

- La actividad isotópica nos indica que se produce una cierta síntesis de proteínas, justamente en los máximos registrados por la D.O.; también hay degradación, aunque en muy pequeña cantidad, de polirribosomas a monosomas, ya que estos últimos aparecen marcados.

En la Tabla 9 se muestra la cantidad relativa de ribosomas y polisomas frente al total ribosómico*, así como la actividad específica correspondiente expresada en 10^3 cpm/u.o.

TABLA - 9 - Homogeneización manual en BH-1 (40 emboladas) Células CAE "in vivo" (Selecionadas a través de gradiente de Ficoll)				
Análisis del gradiente lineal. Rotor A-147				
Figura	Monosomas		Polisomas	
	%	10^3 cpm/u.o.	%	10^3 cpm/u.o.
8	55,3	0,92 **	44,7	1,42
9	54,6	0,87 ***	45,4	1,70

* El cálculo se hizo sumando el valor de la absorción a 260 nm de cada punto y refiriendo cada zona (de la fracción 14 a la 20 y de la 2 a la 14) al total (fracción 2 a la 20), sin contar las subunidades.

** Representa el 39% de la actividad específica total.

*** Representa el 34% de la actividad específica total.

De ella se deduce que hay degradación o pérdida de polirribosomas, dado el elevado valor que alcanzan los ribosomas respecto del total. Puede ser degradación enzimática o mecánica, ya que la actividad específica de los monosomas, aunque es muy baja, representa aproximadamente el 36% del total. Pero por otro lado, en la parte superior del gradiente queda una gran cantidad de material radiactivo asimilado por la célula (es decir, son proteínas de bajo peso molecular), que posiblemente se han desprendido de los polirribosomas, cosa que no sucede en las degradaciones mecánicas ni enzimáticas (104 y 147); luego, ha tenido que producirse después del marcado, posiblemente debida al tiempo que permanecen las células sin nutrientes en el gradiente de Ficoll (5 y 63).

Tampoco se puede descartar la posibilidad de que los polisomas se encuentren de alguna manera atrapados en la pella nuclear, sobre todo en este caso concreto en el que la misma fué grande, teniendo en cuenta que pueden estar unidos al retículo endoplásmico rugoso, y que éste es mas abundante en las proximidades del núcleo.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos anteriormente en la cinética para 40 emboladas, vemos que hay una notable diferencia en cuanto a cantidades relativas obtenidas. Esto puede ser debido a que la homogeneización manual es poco reproducible por lo mucho que afectan a estos niveles las variaciones debidas al operador, aunque no sean apreciables al microscopio.

Para solucionar dos de estos problemas, el del tiempo empleado en la selección celular, y el de la regularidad de la homogeneización, se realizó un aislamiento a partir de células separadas de las sanguíneas por lavados sucesivos en PBS a 0°C centrifugando a 20 x g, 3 minutos, después del marcado y rotas por homogeneización en el punto 3 del motor K-41^{*}. Una cinética previa

* En este punto se alcanzan 1.000 rpm aproximadamente.

seguida ópticamente dió como tiempo adecuado en ese punto el de 1,5 a 2 minutos, manteniendo siempre la temperatura a 0°C.

Los resultados obtenidos se han representado en las figuras 10 y 11. En ambos gradientes se pusieron 17 u.o./ml (en 1 ml) del mismo spm*.

Se observa el mismo pico agudo de experimentos anteriores en la fracción 15, correspondiente a monosomas; en la zona de polirribosomas de la figura 10 aparece uno de 0,5 u.o./ml, en la fracción 10, y en la figura 11 el máximo está en la fracción 5; los demás son menores. Puede ser que la zona de la fracción 10 haya sufrido un deslizamiento hacia la posición 5 en el otro gradiente, ya que el rotor en el que se hace la centrifugación no es oscilante, sino de ángulo fijo (31).

En cuanto a la actividad de síntesis proteínica, se puede apreciar un aumento con respecto a los experimentos anteriores. También nos indica una cierta degradación de los polisomas. La recopilación de estos datos en la Tabla 10, nos dará una idea más clara de lo sucedido.

TABLA - 10 - Homogeneización mecánica vidrio-vidrio en BH-1 Células CAE "in vivo" (Seleccionadas por centrifugación a 20 x g).				
Figura	Análisis del gradiente lineal. Rotor A-147			
	Monosomas		Polisomas	
	%	10 ³ cpm/u.o.	%	10 ³ cpm/u.o.
10	60,4	0,91	39,6	2,35
11	62,8	1,14	37,2	1,76
Valor medio	61,6 ± 1,2	1,03 ± 0,12 ^{**}	38,4 ± 1,2	2,06 ± 0,30

* spm = sobrenadante postmitocondrial.

** Representa el 33% del total.

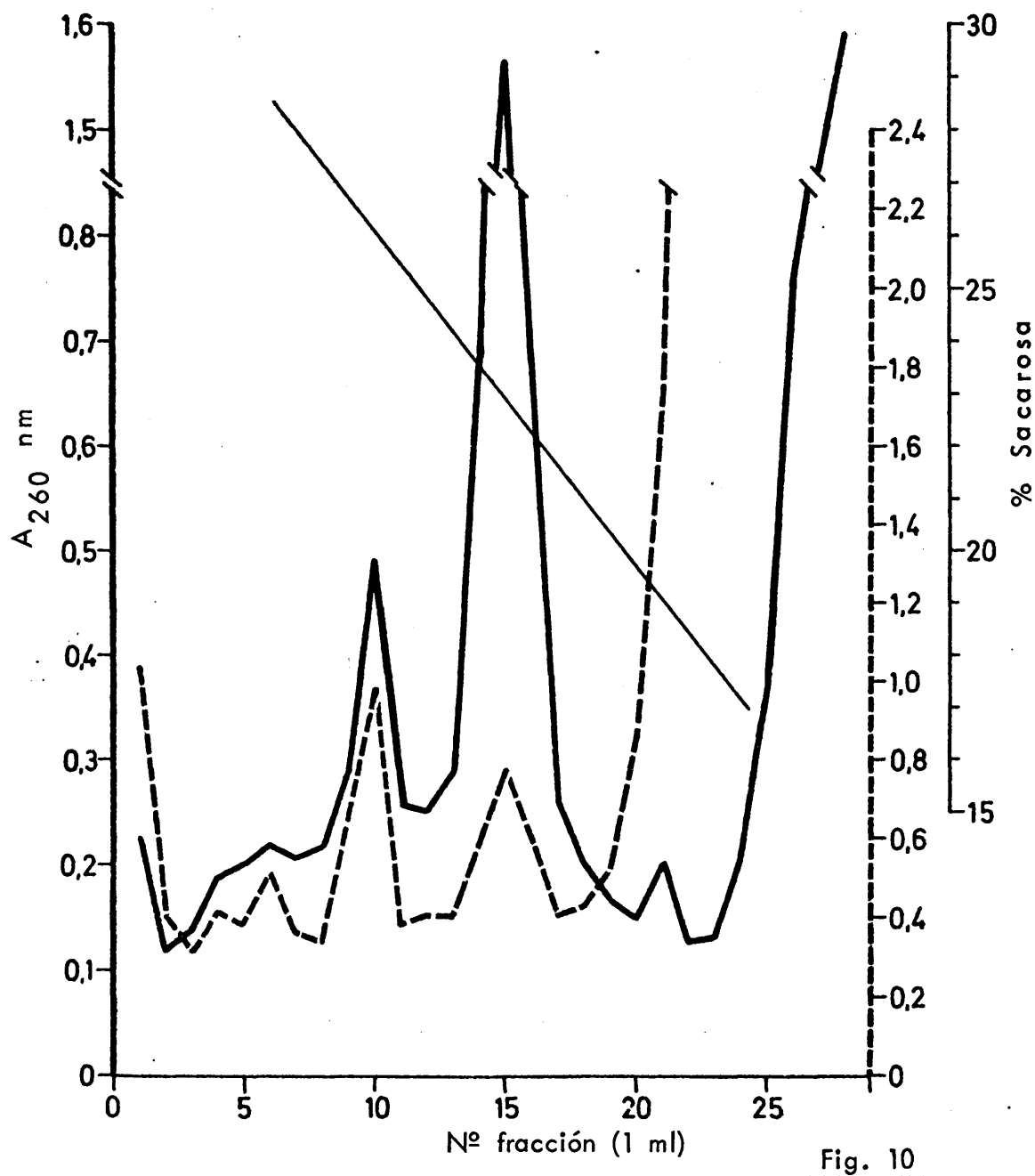


Fig. 10

FIGURAS 10 y 11.- Homogeneización mecánica en BH-1 con émbolo de vidrio (1,5 minutos a 1.000 rpm aproximadamente). Células CAE "in vivo". Como en el caso - descrito en las figuras 8 y 9, el marcado de polipéptidos nacientes se efectúa inmediatamente después de extraer el tumor. Las células rojas se eliminan por lavador sucesivos en PBS, centrifugando a pequeña velocidad.

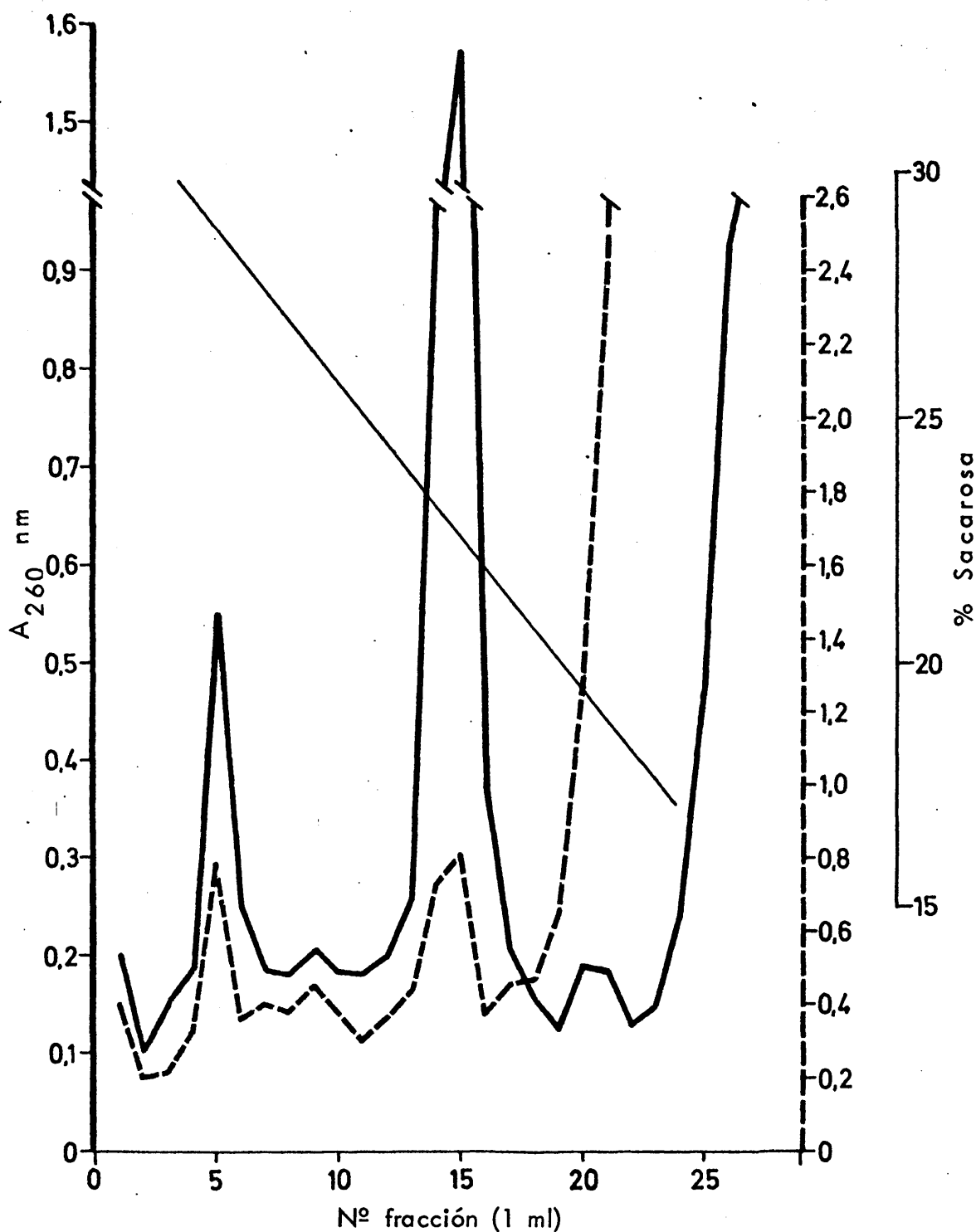


Fig. 11

FIGURAS 10 y 11.- (Continuación)

La purificación del crudo celular se hace como se ha descrito antes. Ambos gradientes, el de la figura 10 y el de la 11, han sido cargados con igual cantidad (17 u.o. en 1 ml) del mismo spm, y se centrifugan simultáneamente 1'5 horas a $100,000 \times g$ en rotor A-147 de ultracentrífuga B-60 de I.E.C.

Se deduce a partir de ella que la degradación debe ser mecánica o enzimática, ya que, aunque los monosomas siguen presentando un 33% de la actividad específica total, en este caso, el tiempo transcurrido entre el avenado de las células y su homogeneización es aproximadamente 30 minutos (durante gran parte del período las células están a cero - grados), lo que nos permite descartar la posibilidad de destrucción del polirribosoma por motivos funcionales.

Es posible que la dispersión de los datos sea debida en parte a que - el rotor es de ángulo fijo (31), sobre todo teniendo en cuenta que es el mismo spm en ambos gradientes y que están centrifugados simultáneamente.

Experimentos posteriores realizados con estas células y con CAEL "in vivo"* hacen pensar que la degradación está principalmente producida por la homogeneización, y confirman asimismo la introducción de errores producida por el rotor de ángulo fijo.

La técnica se modificó aplicando una homogeneización suave (menos tiempo y a velocidad mas pequeña), y centrifugando los gradientes lineales - en rotor oscilante SB-110 en ultracentrífuga B-60 de I.E.C. durante 2 horas a 110.000 x g. Los resultados obtenidos se han representado en las figuras 12, 13 y 14. Quizá sea más expresiva la tabulación de los resultados (Tabla 11), ya que nos permite comparar cuantitativamente con los datos anteriores.

* Las células CAEL "in vivo" nos sirven de término de comparación, ya que por no ser hemorrágico el tumor, no es necesario someterlas a lavados después de marcar los polipéptidos nacientes.

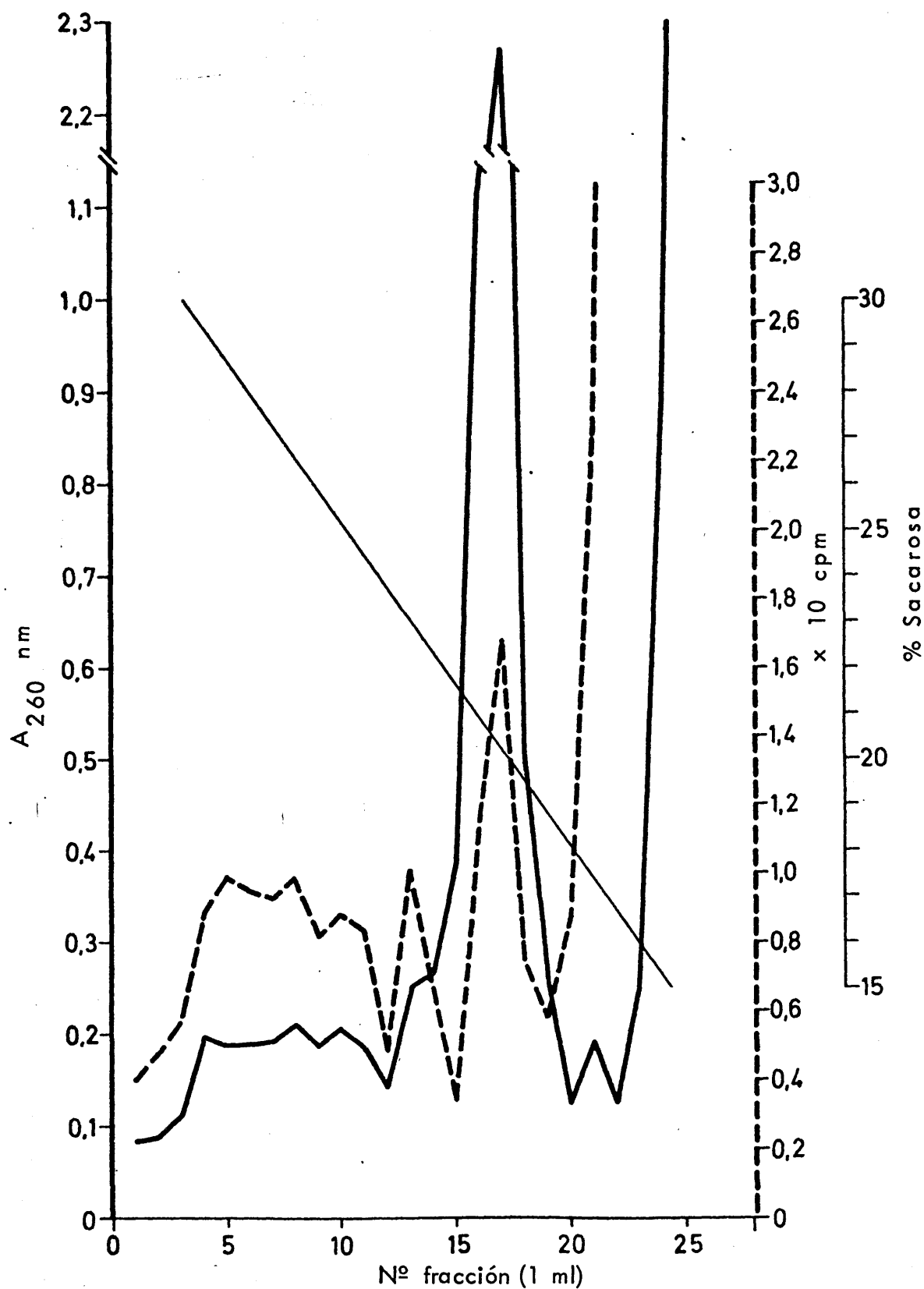


Fig. 12

FIGURAS 12 y 13.-Homogeneización mecánica en BH-1, aplicando una fuerza de cizalla menor que en el caso de las figuras 10 y 11. Células - CAE "in vivo". Marcado, como anteriormente.

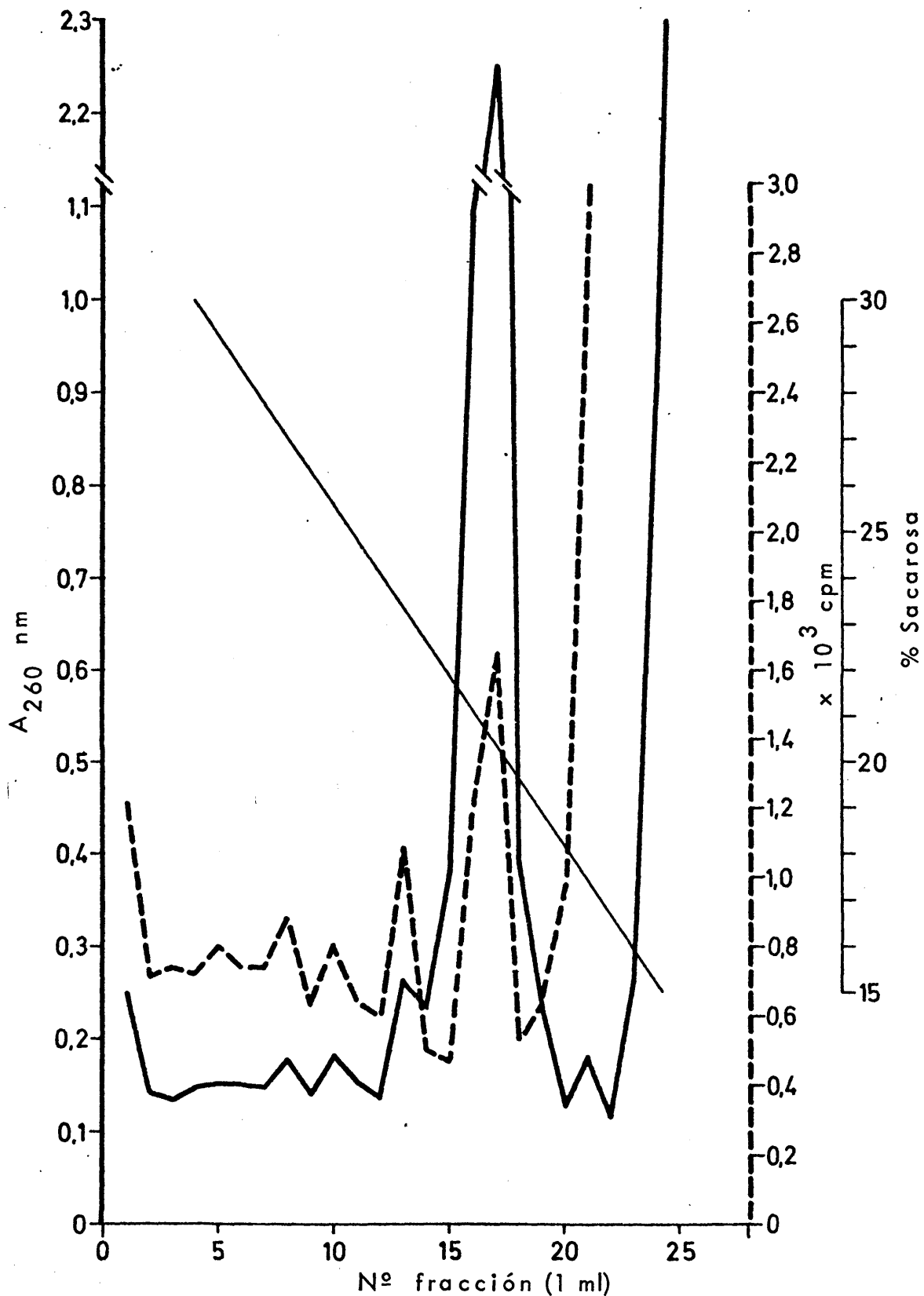


Fig. 13

FIGURAS 12 y 13.- (Continuación)

Eliminación de células rojas por lavados sucesivos en PBS. Spm en gradiente lineal de sacarosa (15-30%) centrifugando 2 horas a $110\,000 \times g$ en rotor SB-110 de ultracentrífuga B-60 de I.E.C.

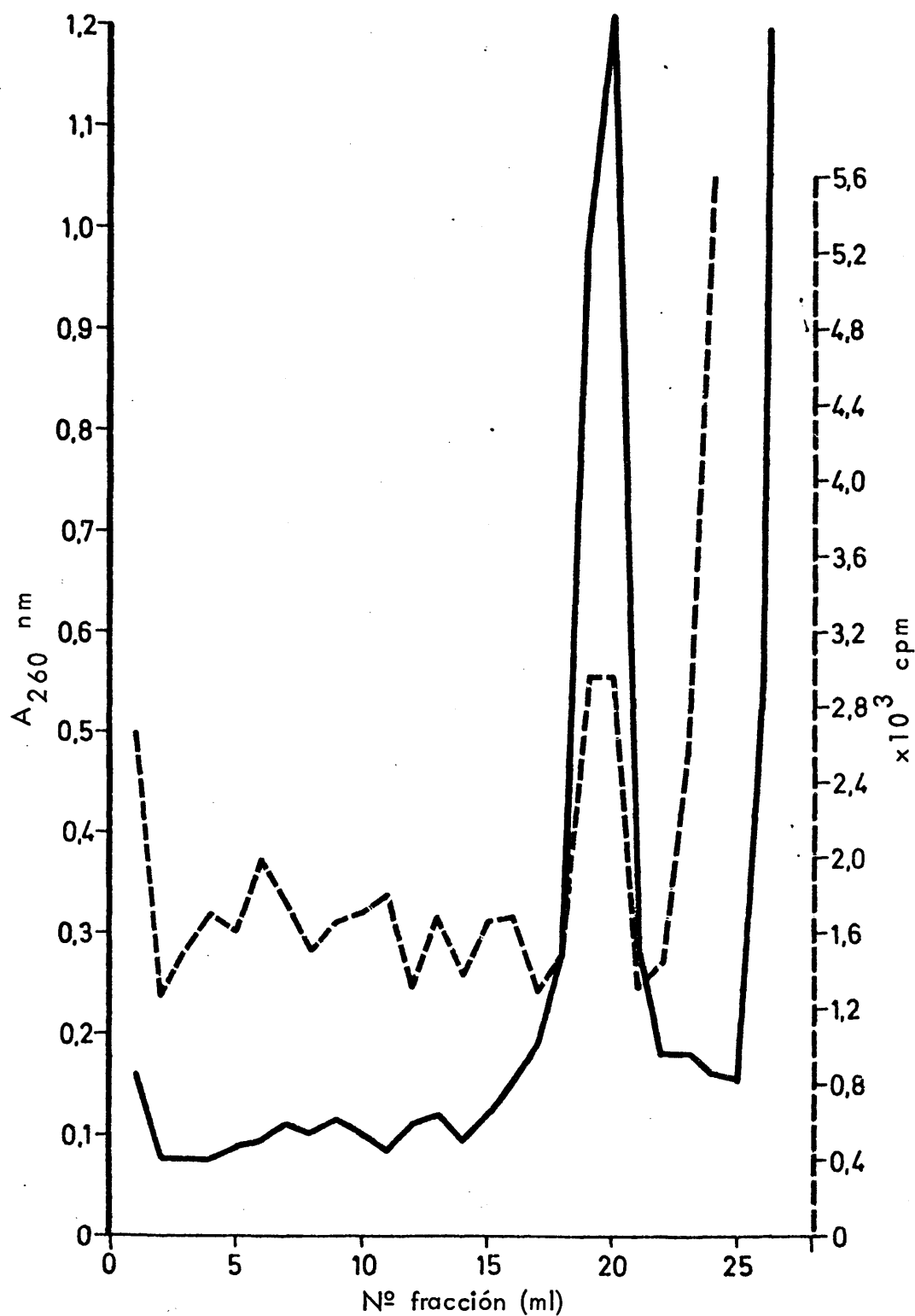


FIGURA 14.- Homogeneización mecánica en BH-1 de iguales características que la aplicada a las células CAE de las figuras 12 y 13. Células CAEL "in vivo". Se sigue la misma técnica que con las células CAE excepto el paso de eliminación de células rojas ya que éstas no existen en el tumor CAEL.

Observamos, primero, que hay un aumento de ribosomas monoméricos y polisomas de bajo peso molecular; segundo, su actividad específica no aumenta en igual proporción y respecto al total experimenta una disminución del 10%; tercero, la actividad específica de los polisomas ha aumentado considerablemente (aproximadamente 2 veces más); y cuarto, la desviación - standard es mucho menor. Es decir, se ha producido una pérdida de polirribosomas en la purificación del spm.

TABLA - 11 - Homogeneización mecánica (vidrio-vidrio) en BH-1 (Condiciones suaves)					
Figura	Células	Análisis del gradiente lineal. Rotor SB-110			
		Monosomas		Polisomas	
		%	10 ³ cpm/u.o.	%	10 ³ cpm/u.o.
12	CAE*	67,2	1,23**	32,8	4,36
13	CAE*	68,5	1,27	31,5	4,43
14	CAEL	65,0	3,40***	35,0	16,11
Valor medio	CAE	67,9±0,7	1,25±0,02	32,2±0,7	4,40±0,04

De todo ello deducimos que: realmente las condiciones de homogeneización juegan un papel importante en la degradación de polirribosomas a monosomas, y concretamente el homogeneizador vidrio-vidrio produce roturas polisómicas en estas células; a la mínima velocidad necesaria para romper la membrana celular, no se recogen todos los polirribosomas posiblemente porque queden

* Seleccionados por lavados sucesivos a 20 x g.

** Representa el 22% del total.

*** Representa el 17% del total.

atrados en la pella nuclear, como ya hemos dicho. Con el rotor oscilante se obtienen datos mas exactos. Por último, al obtener resultados muy parecidos para CAE y CAEL, queda confirmada la no desnaturalización polisómica por falta de nutrientes.

V.1.1.2.- Homogeneizador vidrio-teflon. (Buffer BH-2).

Con este otro tipo de homogeneizador se obtuvieron resultados gráficamente muy diferentes. También se cambió la composición del buffer hipotónico por otra de mayor protección frente a RNasas (BH-2, Tabla 7) y se procedió a isotonizar el crudo con solución de sacarosa (0,25 M concentración final) - inmediatamente después de la homogeneización, antes de purificar por centrifugación diferencial. El resto de la técnica se realizó como en las homogeneizaciones anteriores. El gradiente lineal se preparó con el mismo buffer BH-2 y se centrifugó 2 horas a 25 000 rpm (110 000 x g), a 4°C en rotor SB-110.

El aislamiento se hizo a partir de células CAEL "in vivo" y se ha representado en la figura 15. En ella se ve un claro aumento de la cantidad y actividad isotópica de los polisomas, al mismo tiempo que se separan en 4 picos diferenciados con cierta nitidez.

TABLA - 12 - Homogeneización mecánica (vidrio-teflon) en BH-2. Células CAEL "in vivo"				
Figura	Análisis del gradiente lineal. Rotor SB-110			
	Monosomas		Polisomas	
	%	10 ³ cpm/u.o.	%	10 ³ cpm/u.o.
15	59,0	2,56	41,0	4,84

Comparando los valores relativos de la tabla 12 con los de CAEL en la 11 vamos que realmente se produce un aumento en la cantidad de polisomas. En este caso la elevada actividad específica de los monosomas (34% del total) se debe mas bien a que el gradiente se cargó con un exceso de material y los ribosomas no se separan suficientemente de las proteínas de bajo peso molecular que quedan normalmente en la superficie (como se puede ver en la Figura 15).

V.1.1.3.-Análisis del sobrenadante postmitocondrial.

Es posible que algunos núcleos se rompan durante la homogeneización. El control de la consiguiente impurificación por DNA del sobrenadante postmitocondrial se ha realizado por valoración según dos métodos: el de Schmidt-Thannhausser (126) y el de determinación colorimétrica cuantitativa de desoxirribosa de Dische (39), modificado por Burton (26).

Ambos dieron negativo, lo que indica que no hay DNA por encima de los niveles apreciables por estas técnicas, que son de 3 a 5 μg de DNA por ml.

La valoración de proteínas se llevó a cabo siguiendo el método colorimétrico de Lowry (85).

El RNA se determinó por el método de Schmidt-Thannhausser y por valoración cuantitativa colorimétrica siguiendo la reacción con orcinol, método este último basado en la reacción de Bial, (12) adaptada por Meijbaum (89).

Los resultados obtenidos a partir de 10 sobrenadantes, procedentes de otros tantos homogenados de 40×10^6 células/ml, fueron :

RNA ($\mu\text{g/ml}$)	Proteínas ($\mu\text{g/ml}$)	DNA ($\mu\text{g/ml}$)
300 ± 10	1.300 ± 12	---

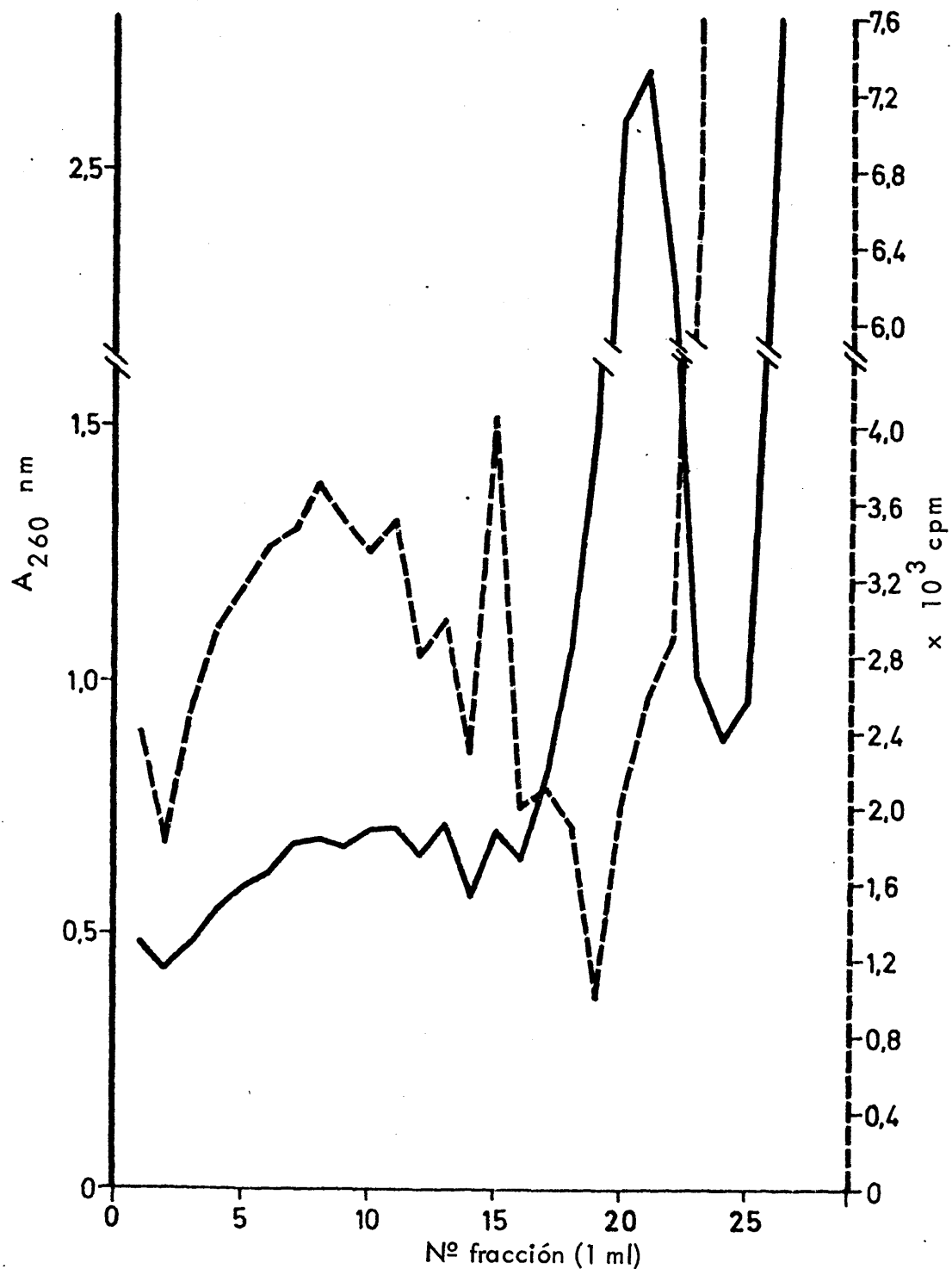


FIGURA 15.- Homogeneización mecánica en BH-2. Embolo de teflon. Células CAEL "in vivo". Después de homogeneizar se isotoniza el medio añadiendo solución concentrada de sacarosa hasta concentración final de 0,25 M. La purificación del crudo se hace también por centrifugación fraccionada; el spm se centrifuga a través de gradiente lineal de sacarosa de 15-30% (preparado en el mismo buffer del aislamiento) 2 horas a 110.000 x g en rotor SB-110.

Estos datos confirman lo observado al microscopio respecto a la no rotura de núcleos. Por otra parte, la presencia de mitocondrias haría que los valores de RNA y proteínas hallados fuesen mucho más altos.

V.1.2.- Detergente no iónico.

Se han realizado numerosos estudios sobre la acción de los detergentes iónicos y no iónicos en los polirribosomas, tanto en su aspecto estructural, como funcional (17, 48, 64 y 99).

En ellos se ha visto una clara influencia de la fuerza iónica (48) del buffer en el que se haga la lisis, así como del pH; ambos factores potencian la capacidad del detergente de liberar los polisomas del retículo endoplásmico rugoso.

Nosotros estudiamos este fenómeno en nuestras células con dos valores de fuerza iónica, usando Triton X-100 en dos concentraciones finales: 0,1 y 0,5%.

V.1.2.1.- Fuerza iónica baja.

Células CAEL "in vivo" lavadas y marcadas con hidrolizado proteico ^{14}C como anteriormente, se suspende en BI-2 (Tabla 7) hasta alcanzar 50×10^6 células/ml, y se añade un volumen 10^{-2} veces de Triton X-100 al 10% * (0,1% concentración final).

En baño de hielo y pipetando suavemente, se dejó actuar el detergente durante 10 minutos.

* La solución de Triton X-100 al 10% se prepara en un buffer de igual composición que el BI-2 excepto la sacarosa y el β -mercaptoetanol, que no los contiene.

En ese tiempo se tomaron pequeñas muestras para ser observadas al microscopio. El citoplasma tarda en solubilizarse totalmente, quedando en parte adherido al núcleo.

Tras una sola centrifugación a $700 \times g$ de 5 minutos, se coloca 1 ml del crudo sobre un gradiente lineal de sacarosa preparado también en el buffer de la lisis. El perfil de sedimentación obtenido se ha representado en la figura 16. Los polirribosomas son muy escasos, aunque presentan una buena actividad de síntesis. Hay degradación, probablemente enzimática, de los polirribosomas a monosomas.

Un aumento de la concentración de Triton X-100 (0,5% final) conduce a una lisis inmediata de la membrana citoplásmica, así como a una mejor solubilización del citoplasma en general, viéndose los núcleos totalmente libres de él. El perfil obtenido se muestra en la figura 17. Se sigue observando una intensa degradación enzimática. Los polisomas son más numerosos, apareciendo un pico de D.O. en la fracción 18 que corresponde a dímeros o a trímeros. A este pico le corresponde otro de radiactividad. En la figura 16 no se aprecia el de D.O. a esa altura, sin embargo, está perfectamente definido el de actividad isotópica lo que indica la existencia de esos polisomas de bajo coeficiente de sedimentación, y que su banda está solapada con la de monómeros.*

La radiactividad manifiesta, apareciendo en bandas perfectamente definidas, una intensa biosíntesis. Lógicamente, los picos de actividad se corresponden con los de D.O., aunque éstos son menos nítidos.

Aumentando la intensidad del tratamiento lítico con una pequeña homogeneización (3 golpes de pistón de teflon) a continuación del Triton X-100 0,5%,

* Este efecto se ha tenido en cuenta en el cálculo de la actividad específica (Tabla 13), ya que se repite en otros aislamientos.

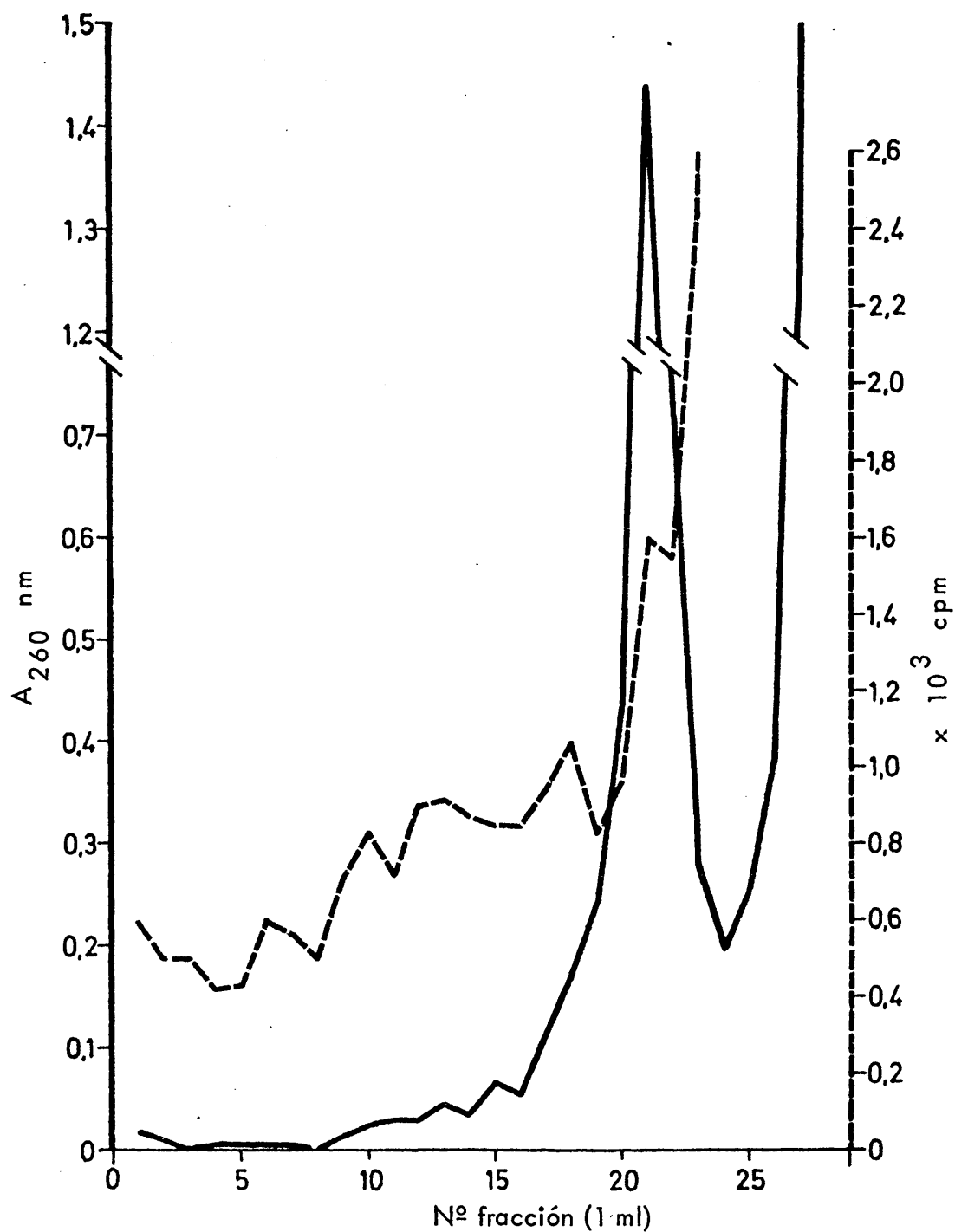


FIGURA 16.- Perfil polisómico obtenido a partir de células CAEL "in vivo", lisadas con 0,1% de Triton X-100 en buffer BI-2 (fuerza iónica baja). El sobrenadante de 700 x g se coloca sobre un gradiente lineal de sacarosa y se centrifuga 2 horas a 110.000 x g en rotor SB-110. - Fracciones de 1 ml.

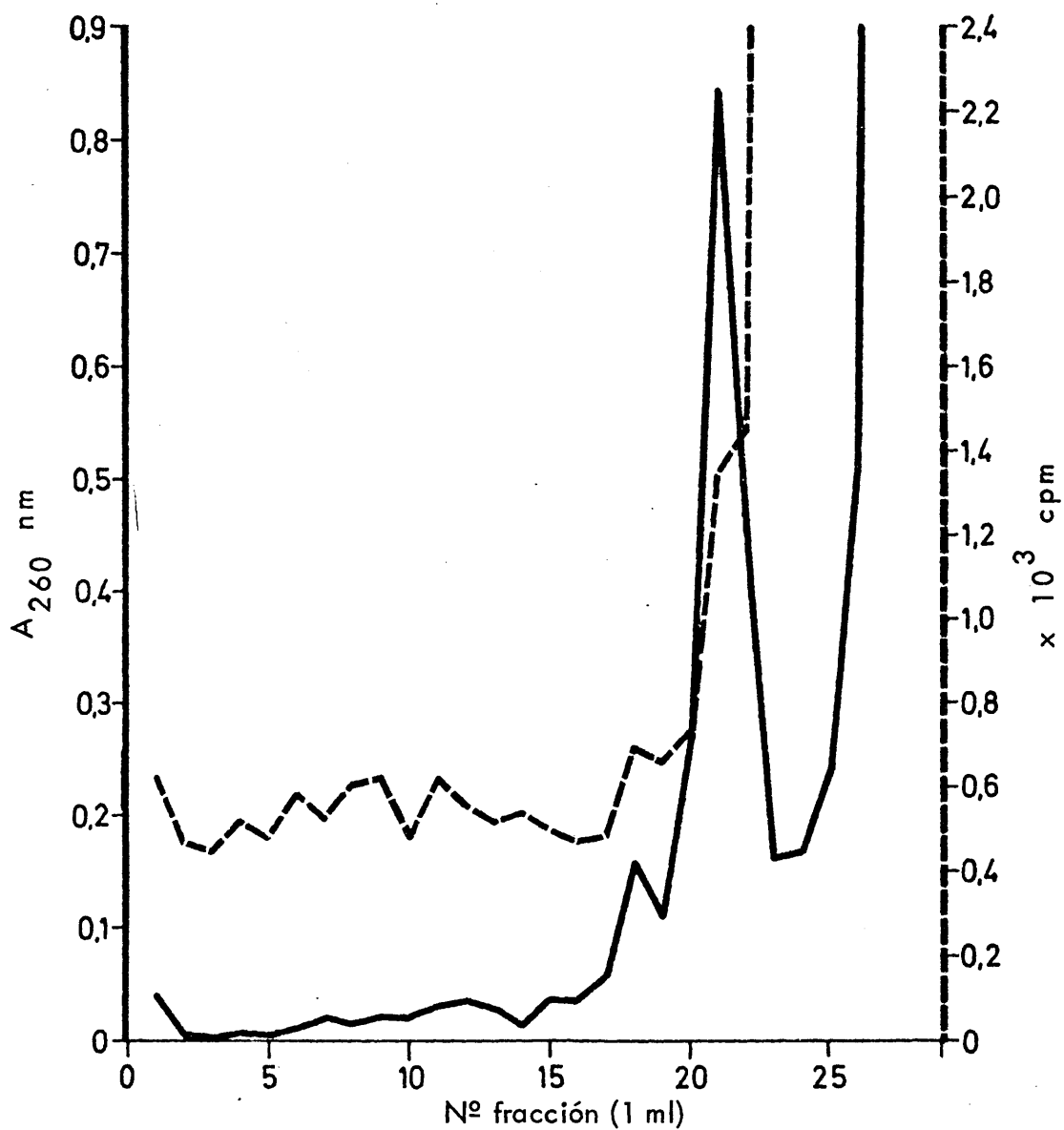


FIGURA 17.- Perfil polisómico obtenido a partir de células CAEL "in vivo", lisadas con 0,5% de Tritón X-100 en BI-2. La técnica seguida es la misma que se utilizó en la Figura 16.

se obtiene el perfil mostrado en la figura 18, muy parecido a los anteriores. Hay degradación de polisomas, actividad de síntesis, los dímeros activos (fracciones 13 a 17) están solapados con los monómeros (fracciones 17 a 22), y se puede apreciar un pico en la fracción 23 debido a subunidades.

TABLA - 13 - Cinética de lisis con Triton X-100 en BI-2.
Células CAEL "in vivo".

Triton X-100 (%)	Análisis del gradiente lineal de sacarosa.					
	Monosomas		Dímeros		Polisomas	
	%	10^3 cpm/u.o.	%	10^3 cpm/u.o.	%	10^3 cpm/u.o.
0,1	78,1	2,95 *	13,6	6,34	8,3	30,60
0,5	67,3	2,84 * *	12,5	7,15	20,2	26,78
0,5 y 3 golpes de pistón	54,5	4,88 * * *	21,5	9,26	24,0	20,12

* Representa el 7,4% del total de la actividad registrada.

* * Representa el 7,7%.

* * * Representa el 14,2%.

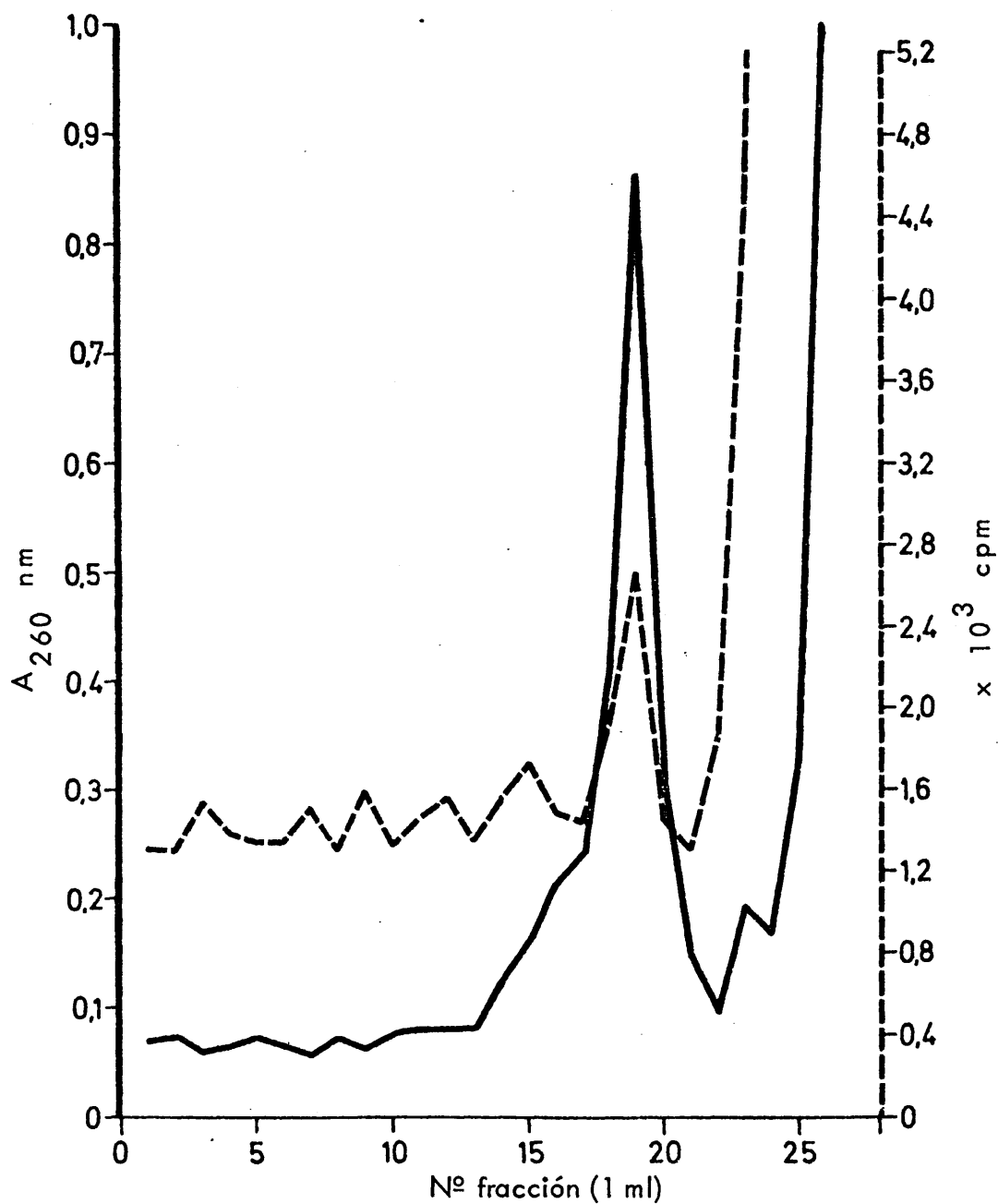


FIGURA 18.- Lisis con 0,5% de Triton X-100 y 3 golpes de piston de teflon en buffer BI-2. Células CAEL "in vivo". Técnica de aislamiento igual a la de la Figura 16.

TABLA - 14 - Cinética de lisis con Triton X-100 en BI-2. Células CAEL "in vivo"		
Rendimiento ribosómico (u.o./10 ⁸ células)		
Triton X-100 0,1%	Triton X-100 0,5%	Triton X-100 0,5% y 3 emboladas.
7,7	7,4	7,7

En la Tabla 13 se resumen los valores relativos al total ribosómico de monosomas, dímeros y polisomas, así como la actividad específica de las tres zonas; en la 14, hemos recogido los rendimientos de cada sistema expresados en u.o. debidos a ribosomas en general (tanto polisomas como monosomas), y m-RNA por cada 10⁸ células de partida.

Vemos en la Tabla 13 que la cantidad de polisomas recogidos aumenta considerablemente al hacer más enérgica la lisis (pasa de 8,3% con 0,1% de Triton X-100 a 24,0% con Triton X-100 al 0,5% y homogeneización suave). Por otra parte, la degradación enzimática de los polisomas a ribosomas marcados con ¹⁴C aumenta también en el mismo sentido, siendo casi igual para ambas concentraciones de Triton X-100 (en los monosomas se encuentra el 7,4 y 7,7% de la actividad total respectivamente) y el doble (14,2%) al disolver con émbolo de teflon.

Comparando estos datos con los obtenidos al homogeneizar en BH-1, vemos que la degradación es mucho menor cuando se emplea Triton X-100 (los monosomas contienen del 7 al 14% de la actividad).

Si en el tercer sistema (Triton X-100 al 0,5% y 3 golpes de pistón) se han obtenido mas polirribosomas, y la degradación ha sido también mayor, quiere decir que en los otros dos los polirribosomas se han perdido en la purificación fraccionada del crudo celular, probablemente atrastrados por los núcleos en su sedimentación. En contraposición con esta deducción, vemos que los rendimientos de los tres sistemas (Tabla 14) son iguales.

V.1.2.2.- Fuerza iónica alta.

Usando el buffer BI-3 (Tabla 7), isotónico y de fuerza iónica mayor que el anterior (BI-2), en un proceso totalmente paralelo al seguido con BI-2, se obtienen los resultados que se muestran a continuación.

En la figura 19 se ha representado el perfil de sedimentación obtenido a partir de células CAEL "in vivo", lisadas con Triton X-100 al 0,1% (concentración final). La absorción a 260 nm registra una cantidad apreciable de polirribosomas distribuidos en 4 ó 5 zonas; dos poco separadas : de la fracción 1 a la 5, y de la 5 a la 9; y tres claramente diferenciables : de la 9 a la 11, de la 11 a la 13, y de ésta a la 15. A continuación se encuentran los dímeros, aunque solapados por la banda de monosomas. Esta, presenta su máximo en la fracción 20 y es de 1,9 u.o./ml., y un hombro en las fracciones 21 y 22.

La radiactividad indica una gran actividad, incluso de los dímeros, correspondiendo el máximo, por parte de los polisomas, a los de 6 o 7 unidades (fracciones 5 a 9). Se produce degradación a monosomas.

Con una concentración final de detergente del 0,5%, se obtienen resultados parecidos (figura 20). En este caso se fraccionó el gradiente en alícuotas de 0,5 ml para diferenciar mejor las bandas. Así, se distinguen 4 ó 5 bandas en la zona de los polirribosomas (fracciones 2 a 31), a continuación el pico de los dímeros, poco separado de el de los monosomas, y uno menor en las fracciones 44 a 48, que corresponde al hombro aparecido en la misma zona en el

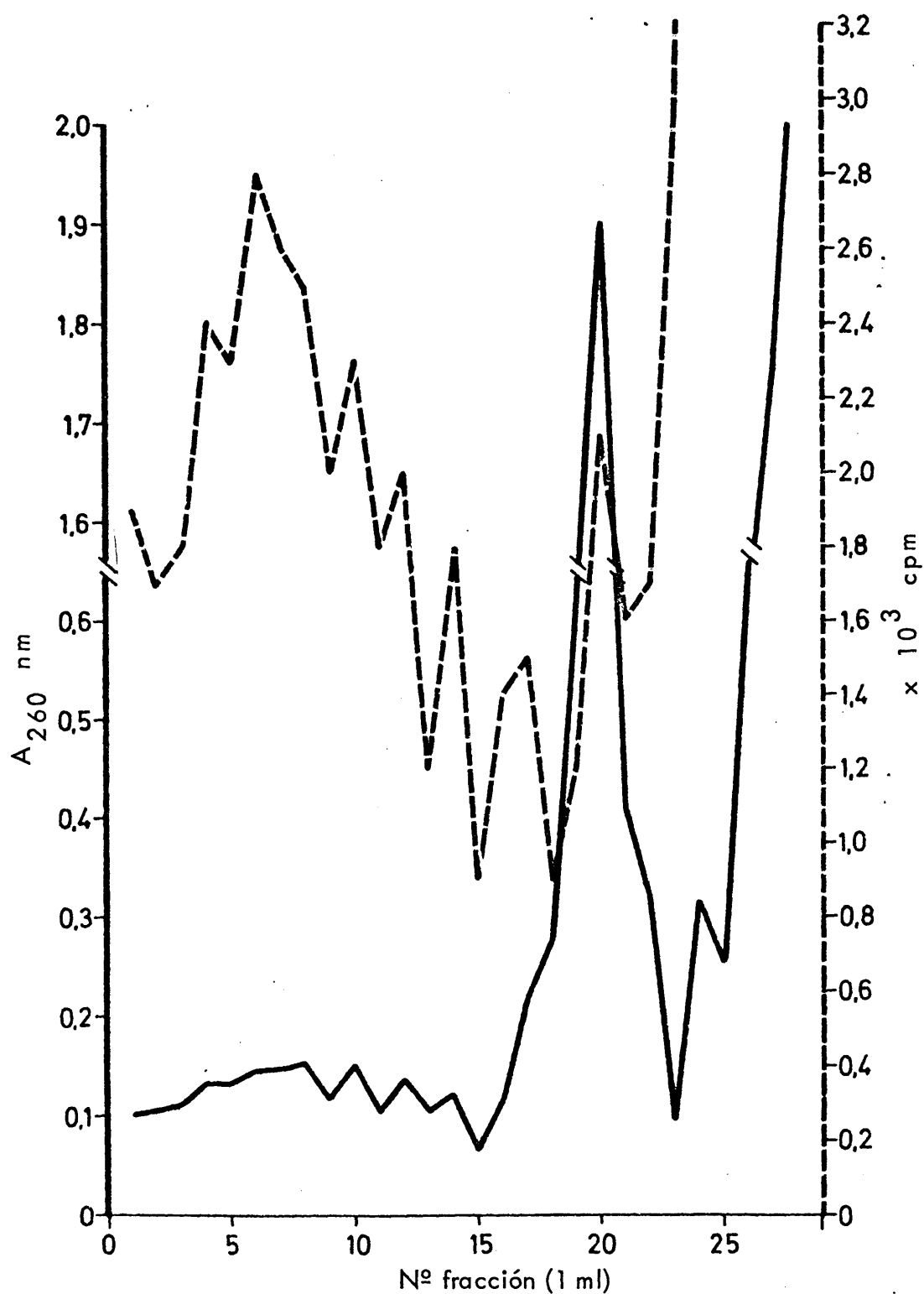


FIGURA 19.- Perfil polisómico obtenido a partir de células CAEL "in vivo" lisadas con 0,1% de Triton X-100 en buffer BI-3 de fuerza iónica mayor que el anterior (BI-2). Técnica de aislamiento igual a la utilizada en la Figura 16.

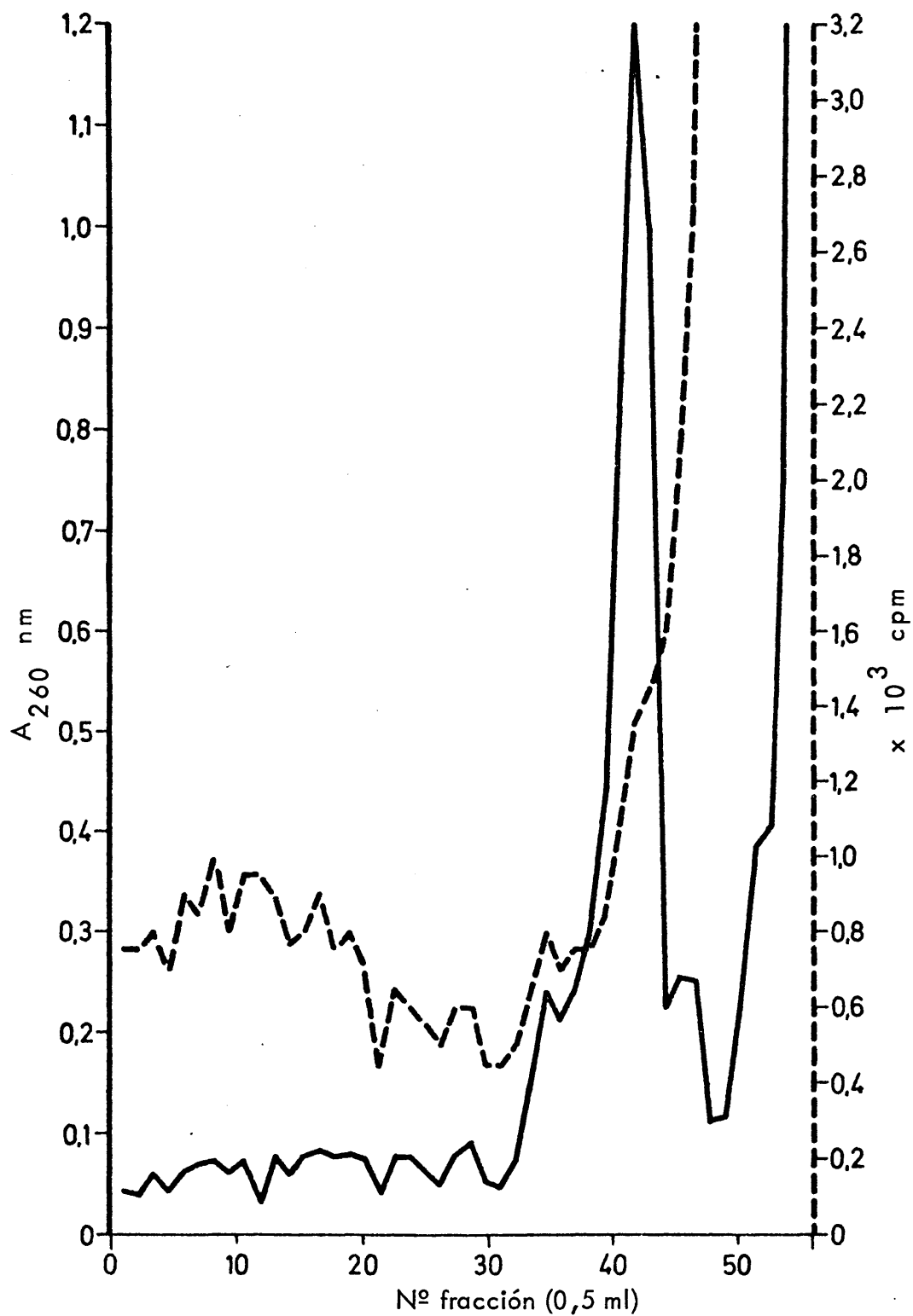


FIGURA 20.- Lisis con 0,5% de Triton X-100 en BI-3. Células CAEL "in vivo". Fracciones de 0,5 ml para aumentar la resolución. Se utiliza la técnica de aislamiento descrita en la Figura 16.

experimento anterior. Esto indica la existencia de partículas de coeficientes de sedimentación muy próximos, y por tanto, difícilmente separables.

La actividad de síntesis también es considerable, y el máximo lo siguen presentando los hexámeros o heptámeros.

Al disolver el citoplasma con ayuda del homogeneizador de teflon (3 golpes de pistón), se intensifica extraordinariamente la degradación de los polisomas (figura 21).

TABLA - 15 - Cinética de lisis con Triton X-100 en BI-3. Células CAEL "in vivo".						
Triton X-100 (%)	Análisis del gradiente lineal de sacarosa.					
	Monosomas		Dímeros		Polisomas	
	%	10^3 cpm/u.o.	%	10^3 cpm/u.o.	%	10^3 cpm/u.o.
0,1	62,0	2,51*	9,3	7,77	28,8	16,66
0,5	65,2	1,91**	10,5	4,29	24,3	11,26
0,5 y 3 golpes de pistón	51,7	5,68***	9,7	11,45	38,6	14,71

* Representa el 9,3% del total de la actividad.

** Representa el 10,9% del total de la actividad.

*** Representa el 17,8% del total de la actividad.

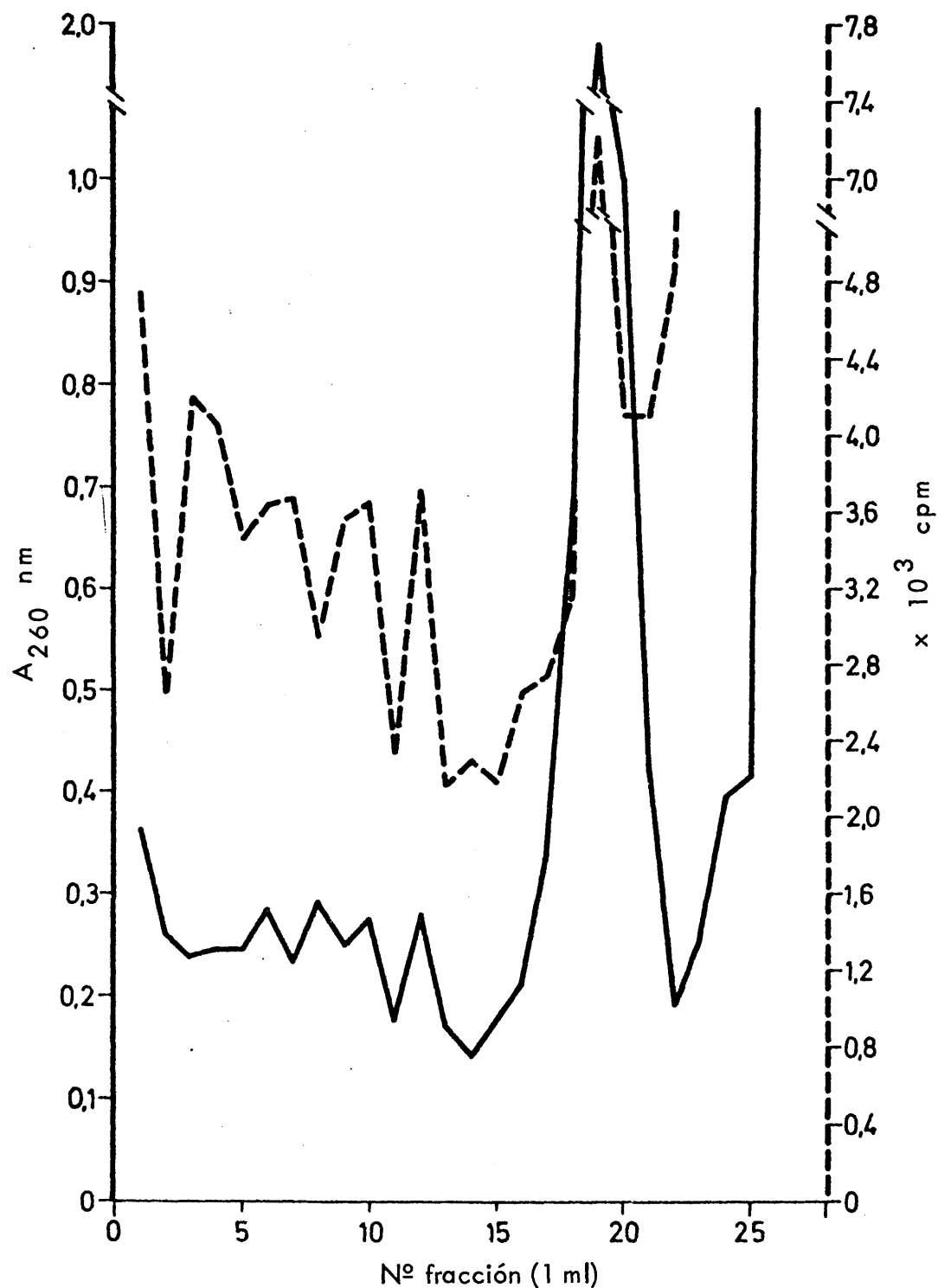


FIGURA 21.- Lisis de células CAEL "in vivo" con Triton X-100 al 0,5% y tres golpes de piston de teflon. Buffer BI-3. La misma técnica emplea da en la Figura 16.

Las cantidades relativas de polisomas aislados con cada concentración de detergente, son prácticamente las mismas (Tabla 15); la distribución en monómeros, dímeros y polirribosomas es igual en ambos casos. La disolución con el émbolo de teflon favorece el desprendimiento de polisomas, sin que aumente la cantidad relativa de monómeros (incluso disminuye).

Estos datos unidos a los de la Tabla 16 nos indican claramente que el detergente por sí solo a esas concentraciones no es capaz de desprender totalmente los polisomas, o de impedir que sean arrastrados por los núcleos, incluso en esta fuerza iónica mayor.

TABLA - 16 - Cinética de lisis con Triton X-100 en BI-3. Células CAEL "in vivo".		
Rendimiento ribosómico (u.o./10 ⁸ células)		
Triton X-100 0,1%	Triton X-100 0,5%	Triton X-100 0,5% y 3 emboladas
11,5	12,6	17,2

Las actividades específicas registradas en la Tabla 15 indican que la degradación aumenta con la intensidad del tratamiento. También aquí éstas son muy parecidas con ambas concentraciones de detergente, y aumentan notoriamente al homogeneizar (la actividad de los monosomas es aproximadamente al 10% del total con Triton X-100 al 0,1% y 0,5% y sube al 18% con 3 golpes de pistón).

La comparación de estos resultados con los obtenidos en la lisis en buffer de

fuerza iónica baja, BI-2, que se resume en la Tabla 17, nos lleva a interesantes conclusiones :

a) Para una concentración baja de detergente (0,1%) el aumento de la fuerza iónica produce un incremento de más de 3 veces en el rendimiento de polisomas, aunque su actividad específica disminuye; se da una disminución en el número de monosomas y en el de dímeros, manteniendo una actividad parecida en el caso de los monosomas, y duplicándose en el de los dímeros.

b) Con 0,5% de Tritón X-100, la cantidad de polisomas, así como la distribución en pesos moleculares del resto del conjunto ribosómico aislado es muy similar en ambas fuerzas iónicas. La degradación producida es ligeramente mayor en fuerza iónica alta, y la actividad específica de los polirribosomas menor.

c) Cuando se fuerza la solubilización del detergente al 0,5% con el pistón de teflon, se produce con fuerza iónica alta, un aumento de la cantidad de polisomas obtenidos. La actividad específica de éstos sigue siendo menor que en fuerza iónica baja. Los dímeros disminuyen a la mitad en fuerza iónica alta, presentando, sin embargo, una actividad mayor. Y los monosomas se mantienen prácticamente inalterados.

V.1.3.- Análisis comparativo de ambos métodos de lisis.

En la Tabla 18, se han reunido los resultados obtenidos con los dos sistemas de lisis estudiados, homogeneización y lisis química, aplicados a células CAEL.

Las condiciones de centrifugación son las mismas en todos los experimentos, por lo cual sus respuestas se pueden comparar unas con otras, y determinar las ventajas e inconvenientes de un sistema de lisis frente al otro.

Asimismo, podemos estudiar la influencia de la fuerza iónica y de la concentración de detergente en el perfil polisómico y en el rendimiento ribosómico.

TABLA - 17 - Influencia de la fuerza iónica y de la concentración de detergente. Células CAEL "in vivo".									
Detergente no iónico (%)	Relación Cat ⁺ /Cat ²⁺ (mM)	Rendimiento ribosómico (u.o./10 ⁸ cél.)	Análisis del gradiente lineal de sacarosa.						
			Monosomas		Dímeros		Polisomas		
			% u.o.	% Ac.	% u.o.	% Ac.	% u.o.	% Ac.	
0,1	25 : 2 *	7,7	78,1	7,4	13,6	15,6	8,3	77,0	
0,1	150 : 5 **	11,5	62,0	9,3	9,2	28,8	28,8	61,9	
0,5	25 : 2	7,4	67,3	7,7	12,5	19,5	20,2	72,8	
0,5	150 : 5	12,6	65,2	10,9	10,5	24,6	24,3	64,5	
0,5 hom.	25 : 2	7,7	54,5	14,3	21,5	27,0	24,0	58,7	
0,5 hom.	150 : 5	17,2	51,7	17,8	9,7	36,0	38,6	46,2	

* Buffer BI-2 de la tabla 7

** Buffer BI-3 de la tabla 7

El rendimiento global más elevado ($17,2 \text{ u.o.}/10^8$ células) es el que se obtiene con 0,5% de Triton X-100 en fuerza iónica alta (150 : 5), ayudando a solubilizar las membranas con el émbolo de teflon. En estas condiciones experimentales se obtiene también la máxima cantidad de polisomas (38,6%).

El porcentaje de actividad isotópica mostrado por los monosomas correspondientes, es el mas alto después del que presentan los obtenidos por homogeneización en buffer de fuerza iónica intermedia.

Otro sistema en el que se obtiene buena recuperación, es el tratado con 0,5% de Triton X-100 en solución 150 : 5, sin homogeneización posterior. Sin embargo, la cantidad de polisomas es pequeña (24,3%), siendo la mayor parte monosomas (65,7%).

Una recuperación parecida muestra la homogeneización en buffer de fuerza iónica intermedia (25 : 2). El perfil es rico en polisomas y con buena actividad en éstos. La desnaturalización es grande, ya que los monosomas poseen el 27,2% de toda la actividad registrada, aunque esto puede ser un artefacto del gradiente; el sobrenadante postmitocondrial conteniendo los polisomas y restos proteicos marcados, se coloca sobre el gradiente lineal de sacarosa. En casi todos los casos parte de la radiactividad ligada a proteínas de bajo peso molecular, contamina la banda de los monosomas, en mayor o menor medida, y se puede tomar como procedente de la degradación de polirribosomas. Es necesaria una purificación mas intensa de los ribosomas y polirribosomas, o bien, medir la actividad isotópica de esa zona del gradiente, precipitando las macromoléculas (RNA y proteínas ligadas al ribosoma) con TCA.

Teniendo todo esto en cuenta, y que el resto del perfil polisómico es de los mejores, ya que tiene el mínimo de monosomas, máximo de dímeros (o polisomas ligeros) y una gran cantidad de polisomas, podemos pensar que es el sistema de mejores resultados. Por otra parte, tiene la ventaja de permitir diferenciar entre polisomas libres y unidos a membranas, ya que no interviene el detergente - en la lisis celular.

TABLA - 18 -
Influencia del método de lisis.
Células CAEL "in vivo".

Relación $\text{Cat}^+/\text{Cat}^{2+}$ (mM)	Detergente no iónico (%)	Rendimiento ribosómico (u.o./10 ⁸ cél.)	Análisis del gradiente líneal de sacarosa.					
			Monosomas		Dímeros		Polisomas	
			% u.o.	% Ac.	% u.o.	% Ac.	% u.o.	% Ac.
10 : 1,5 *	-----	9,1	62,3	16,5	15,0	33,0	22,7	50,5
25 : 2 **	-----	11,4	47,3	27,2	16,3	17,3	36,4	58,5
25 : 2 #	0,1	7,7	78,1	7,4	13,6	15,6	8,3	77,0
25 : 2	0,5	7,4	67,3	7,7	12,5	19,5	20,2	72,8
25 : 2	0,5+hom.	7,7	54,5	14,3	21,5	27,0	24,0	58,7
150 : 5 ##	0,1	11,5	62,0	9,3	9,2	28,8	28,8	61,9
150 : 5	0,5	12,6	65,2	10,9	10,5	24,6	24,3	64,5
150 : 5	0,5+hom.	17,2	51,7	17,8	9,7	36,0	38,6	46,2

* Buffer BH-1

** Buffer BH-2

Buffer BI-2

Buffer BI-3

Con lo visto hasta ahora todavía no podemos decidirnos por uno u otro sistema, ya que nos falta comprobar si los polisomas se pierden en las purificaciones del crudo, o son realmente degradados a monosomas por efecto de las fuerzas de cizalla o de acciones enzimáticas.

Para aclarar un poco este punto, se hizo un estudio del contenido polisómico de las pellas resultantes en la purificación del crudo.

V.2.- ESTUDIO de las PELLAS NUCLEAR y MITOCONDRIAL.

Como hemos ido viendo a lo largo de esta exposición, existe la posibilidad de que parte de los polisomas ligados a membranas permanezcan unidos a éstas aún después del tratamiento con Tritón X-100. La zona del citoplasma próxima al núcleo es la más densa y la más rica en retículo endoplásmico rugoso; es muy probable que la mayor parte de este retículo permanezca unido a los núcleos, y sedimente junto con ellos en la purificación diferencial previa al fraccionamiento en gradiente de sacarosa.

Por otra parte, en la centrifugación a $10.000 \times g$ podrían sedimentar polisomas de elevado peso molecular (si existiesen en esas células), o los unidos a membranas al mismo tiempo que las mitocondrias y pasar desapercibidos.

Estas dudas fueron motivo de que se estudiaran ambas pellas con detenimiento.

Los polisomas que permanecen unidos a la pella nuclear ($700 \times g$) no se pueden liberar tratándola con cualquiera de las soluciones salinas ya empleadas (BI-2 y BI-3). Para ello es necesario una mayor fuerza iónica (48), siendo innecesaria en este caso la presencia del detergente.

En cuanto a los que posiblemente sedimenten junto con las mitocondrias, una simple reextracción a partir de la pella será suficiente para aislarlos, ya que

no están unidos a ellos. Se siguió este proceso utilizando también el mismo buffer de elevada fuerza iónica que se empleó en el tratamiento de la pella nuclear, el BI-5 de la Tabla 7.

V.2.1.- Pella nuclear (700 x g).

El estudio se hizo partiendo de células ERGAN cultivadas en monocapa; fueron marcadas con solución de hidrolizado proteico ^{14}C de $3 \mu\text{Ci/ml}$ en una suspensión con una densidad celular de $25 \times 10^6/\text{ml}$. Este pulso fué insuficiente para los cálculos de radiactividad, pero la D.O. registrada proporcionó los datos necesarios.

Las células se lisaron con 0,5% de Triton X-100 en buffer BI-3* . La pella de 700 x g se resuspendió en BI-5 y se dejó 5 minutos a 0°C . Se centrifugó de nuevo a 700 x g y ambos sobrenadantes, el postnuclear y el de BI-5, se colocaron sobre gradientes lineales de sacarosa (preparados en BI-3) para ser fraccionados como en experimentos anteriores.

Los resultados obtenidos se han representado en las Figuras 22 y 23.

El sobrenadante postnuclear (figura 22) presenta un gran pico de monosomas con el máximo en la fracción 20 de 2,4 u.o./ml. Los dímeros quedan solapados por los monómeros y aparecen con bastante claridad los picos de los trímeros, tetrameros, pentámeros, etc., siendo los de 5 y 6 unidades los mayores.

La actividad de síntesis parece muy baja, pero es debido a que el marcado de las células "in vitro" debe ser mas intenso (de alrededor de $30 \mu\text{Ci/ml}$), como hemos comprobado en experimentos posteriores.

* Se eligió este sistema de lisis porque proporciona valores medios (Tabla 18).

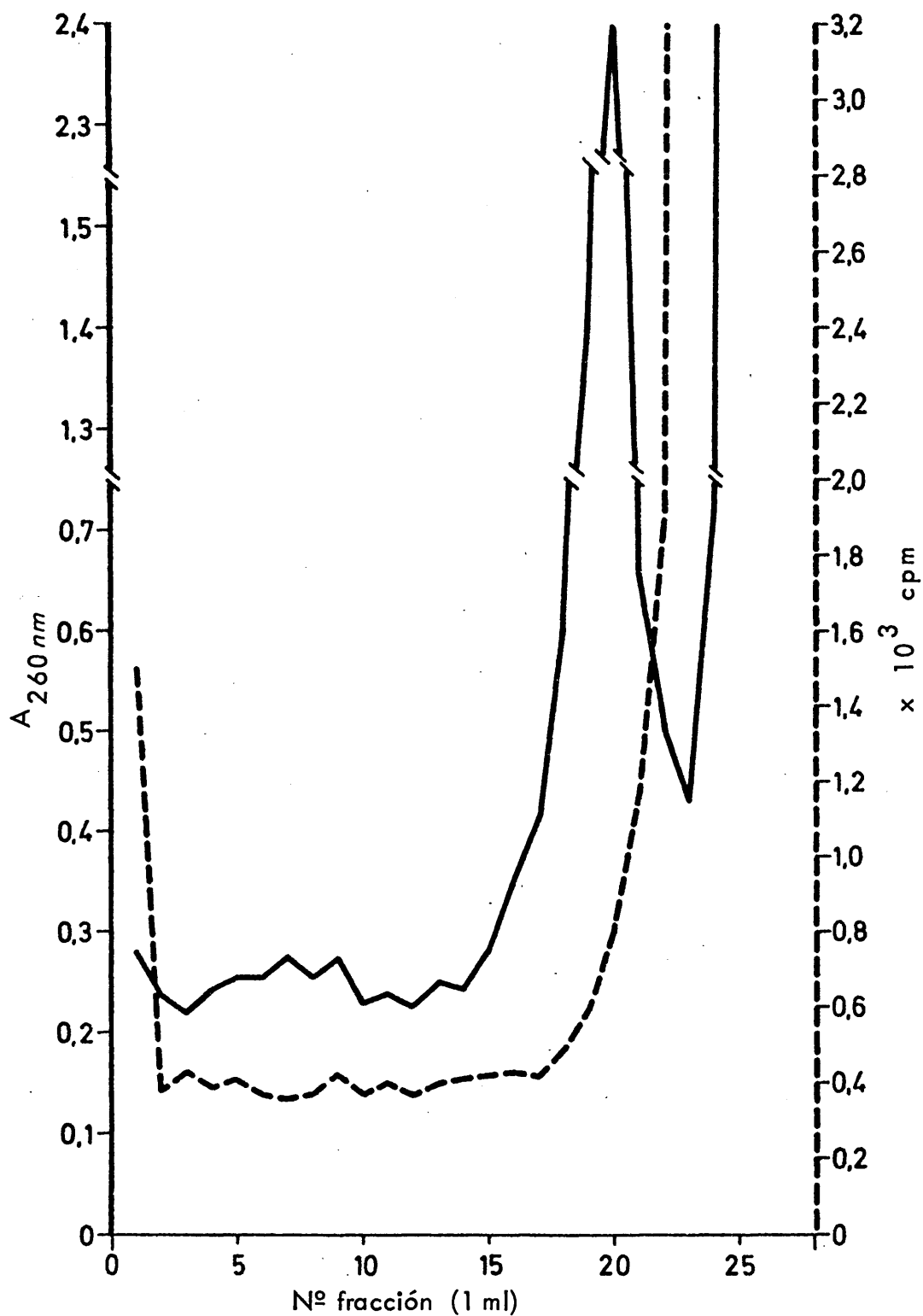


FIGURA 22.- Estudio de la pella nuclear (700 x g). Perfil polisómico presentado por el sobrenadante de 700 x g de células ERGAN lisadas con - Triton X-100 al 0,5% en BI-3.

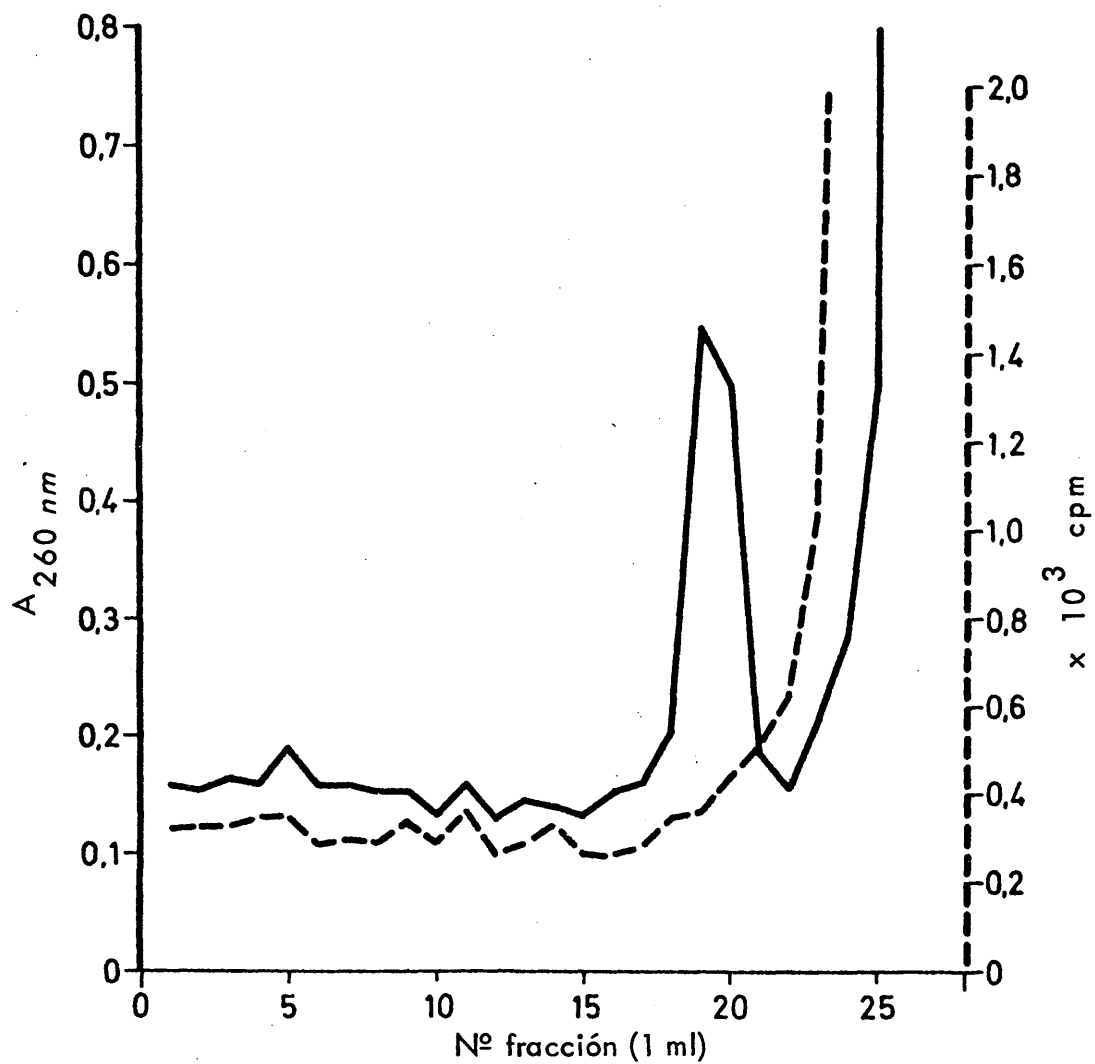


FIGURA 23.- Perfil obtenido después de centrifugar 2 horas a $110.000 \times g$ en rotor SB-110, en gradiente lineal de sacarosa (15-30%), el lavado que se hace con buffer de alta fuerza iónica (BI-5) a la pella nuclear ($700 \times g$) del aislamiento polisómico mostrado en la Figura 22.

En cuanto al lavado de la pella nuclear con solución salina de mayor concentración (figura 23) obtenemos un pico de monosomas con el máximo en las fracciones 19 y 20 de 0,55 u.o./ml.

Entre los polirribosomas el máximo se encuentra en la fracción 5, correspondiente a heptámeros (figura 23).

Se puede deducir que realmente quedan algunos polisomas unidos a los núcleos, aquellos de mayor peso molecular.

TABLA-19 - Actividad ribosómica en el sobrenadante de 700 x g y en su pella. Células ERGAN lisadas con Tritón X-100 0,5 % en BI-3						
Sobrenadante	Análisis del gradiente de sacarosa					
	Monosomas		Dímeros		Polisomas	
	%	10 ³ cpm/u.o.	%	10 ³ cpm/u.o.	%	10 ³ cpm/u.o.
Postnuclear (700 x g)	58,7	1,43	11,9	1,29	29,4	1,58
Lavado de la pella 700 x g	36,6	1,47	9,3	1,82	54,1	1,81

Del total robisómico presente en el sobrenadante postnuclear, el 29,4 % está en forma de polisomas (tabla 19). Si consideramos también los ribosomas separados en el lavado de los núcleos, resulta ser un 20,5 %, y el porcentaje de polisomas que permanecían ligados a la pella es del -- 16,5 % (tabla 20).

En resumen, la lisis con Triton X-100 al 0,5 % (concentración final) en medio isotónico (BI-3) seguido de centrifugación a 700 x g, extrae el - 70 % de los ribosomas del citoplasma celular; el 30 % restante permanece unido a los núcleos. De ese 70 %, un 29 % está en forma de poli

somas (tabla 19) de 5 a 6 unidades principalmente, y el 59 % son monosomas. Del 30 % ligado a los núcleos, el 54 % son polisomas de 7 unidades sobre todo (tabla 19) y el 37 % son monómeros.

Es decir, los polisomas de alto peso molecular son más abundantes en las proximidades del núcleo y se separan con más dificultad, probablemente por encontrarse ligados a membranas. En el resto del citoplasma abundan los ribosomas monoméricos.

Los rendimientos de cada extracción (considerados por separado) fueron muy elevados:

41,0 u.o./ 10^8 células en la primera.

17,9 u.o./ 10^8 células en la segunda.

TABLA-20 - % de ribosomas arrastrados con los núcleos durante la purificación. Células ERGAN lisadas con 0,5% de Tritón X-100 en BI-3				
Sobrenadante postnuclear	Monosomas	Dímeros	Polisomas	Total ribosómico
	40,9 %	8,2 %	20,5 %	69,6 %
Lavado pella 700 x g con BI-5	11,1 %	2,8 %	16,5 %	30,4 %
Total en la célula	52,0 %	11,0 %	37,0 %	100 %

Estos resultados indican que el 0,5 % de Tritón X-100 en BI-3 (relación mM entre cationes 150:5) no es capaz de liberar la totalidad de los polisomas; quedan unidos a los núcleos parte de los polisomas de 7 unidades, por consiguiente no obtenemos un perfil totalmente representativo. Por otra parte, no nos permite distinguir entre polisomas libres y ligados a membranas.

Vamos a ver los resultados de la homogeneización seguida de una purificación más intensa en la pella mitocondrial.

V.2.2.- Pella mitocondrial (10.000 x g)

Se estudió a partir de células CAEL cultivadas en suspensión. Después de un pulso de 5 minutos con hidrolizado proteico ^{14}C de $30 \mu\text{Ci/ml}$ en una suspensión de 50×10^6 células/ml de densidad, se hipotonizan durante 10 minutos en BH-1 y se homogeneizan con émbolo de teflón. El crudo celular se purifica por centrifugación diferencial a $700 \times g$, y el sobrenadante a $10.000 \times g$. El sobrenadante postmitocondrial se lleva a BI-4 y se trata con 1,0 % de Tritón X-100 (concentración final). La pella mitocondrial se guarda a -20°C hasta el momento de su reextracción. El sobrenadante se somete a ultracentrifugación a través de gradiente discontinuo de sacarosa (1,6 M/2,0 M), y la pella polisómica sedimentada se resuspende en BI-4. Se eliminan a continuación los agregados inespecíficos centrifugando a $3.000 \times g$ y el sobrenadante se coloca sobre un gradiente lineal de sacarosa.

La pella mitocondrial se trata con BI-5 y Triton X-100 al 0,5 %, se centrifuga la solución a $3.000 \times g$ al mismo tiempo que los polirribosomas en solución resultantes de la purificación anteriormente citada y se coloca el sobrenadante en un gradiente lineal de sacarosa. Después de centrifugar 2 horas a 25.000 rpm, se fraccionan en alícuotas de 0,5 ml para conseguir mayor resolución. Los resultados se han representado en las figuras 24 y 25.

El fraccionamiento del gradiente del sobrenadante postmitocondrial presenta un gran pico en las fracciones 27 a la 36, con el máximo en la 34 y de 1,8 u.o./ml (figura 24). Por la densidad de la zona del gradiente en que se halla situado, se calcula que no corresponde a monosomas puros, sino a una mezcla de monosomas y dímeros. El pico que aparece a su derecha en la fracción 38 es el de los monómeros puros. En la zona de los polisomas se aprecian claramente 5 picos bastante bien definidos entre los que sobresalen los correspondientes a 5, 6, y 7 unidades (fracciones 13, 9 y 7 respectivamente).

En cuanto a la actividad de síntesis, la presentan más pronunciada los de alto peso molecular, decreciendo hacia los dímeros y siendo muy baja en los monómeros.

El perfil mostrado por la solución de lavado de la pella mitocondrial - (figura 25) presenta un pico de monosomas puros (fracción 42), también de pequeño tamaño. Los dímeros mezclados en parte con monosomas, - son más numerosos como ocurre en el perfil del sobrenadante postmitocon_drial. En la zona de los polisomas se aprecian varios picos bien dife-renciados.

La actividad ligada a ellos sigue la línea determinada por la D.O.

La distribución de ribosomas en diferentes polímeros es prácticamente igual en ambos gradientes (tabla 21).

TABLA-21 - Actividad ribosómica en el sobrenadante de 10.000 x g y en su pella. Células CAEL "in vitro" homogeneizadas en BH-1						
Sobrenadantes	Análisis del gradiente lineal					
	Monosomas		Dímeros		Polisomas	
	%	10 ³ cpm/u.o.	%	10 ³ cpm/u.o.	%	10 ³ cpm/u.o.
spm (10.000 x g)	11,2	1,48	36,3	0,92	52,5	2,26
Lavado pella 10.000 x g	11,0	2,37	32,1	0,83	56,9	1,39

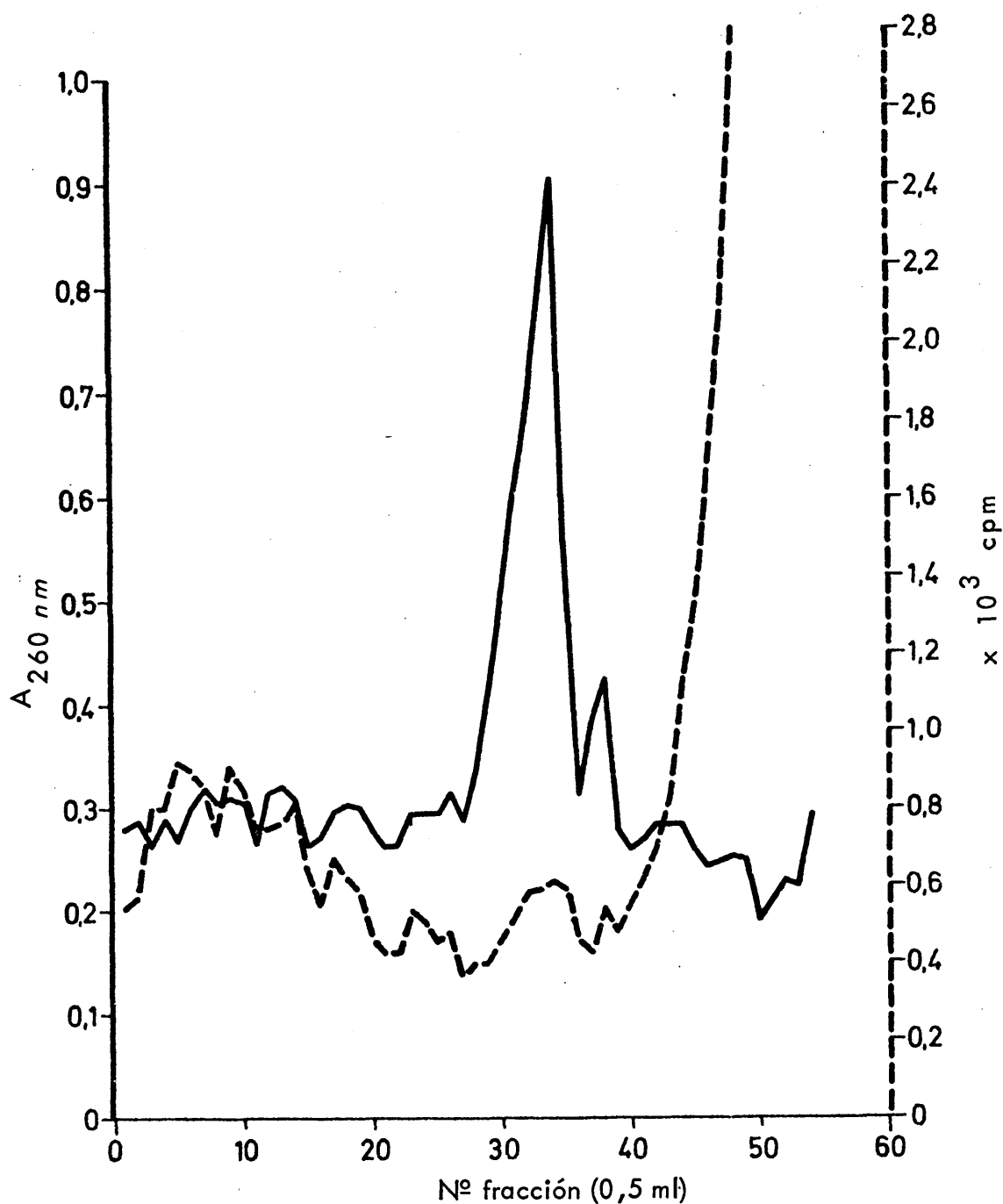


FIGURA 24.- Estudio de la pella mitocondrial. Perfil polisómico del spm de células CAEL "in vitro". Después de ser hipotonizados durante 10 minutos en buffer BH-1, las células se homogeneizaron mecánicamente con émbolo de teflon. El crudo se centrifuga a $700 \times g$ y a $10.000 \times g$. El spm resultante se lleva a buffer BI-4, se trata con 1,0% de Triton - X-100 y se centrifuga 18 horas a 37.000 rpm en rotor A-321 $120.000 \times g$ a través de un gradiente discontinuo de sacarosa ($1,6 M/2 M$) preparado en BI-4. Los polisomas así sedimentados se resuspenden en BI-4 y se fraccionan en gradiente lineal 2 horas a $110.000 \times g$. Fracciones de - 0,5 ml.

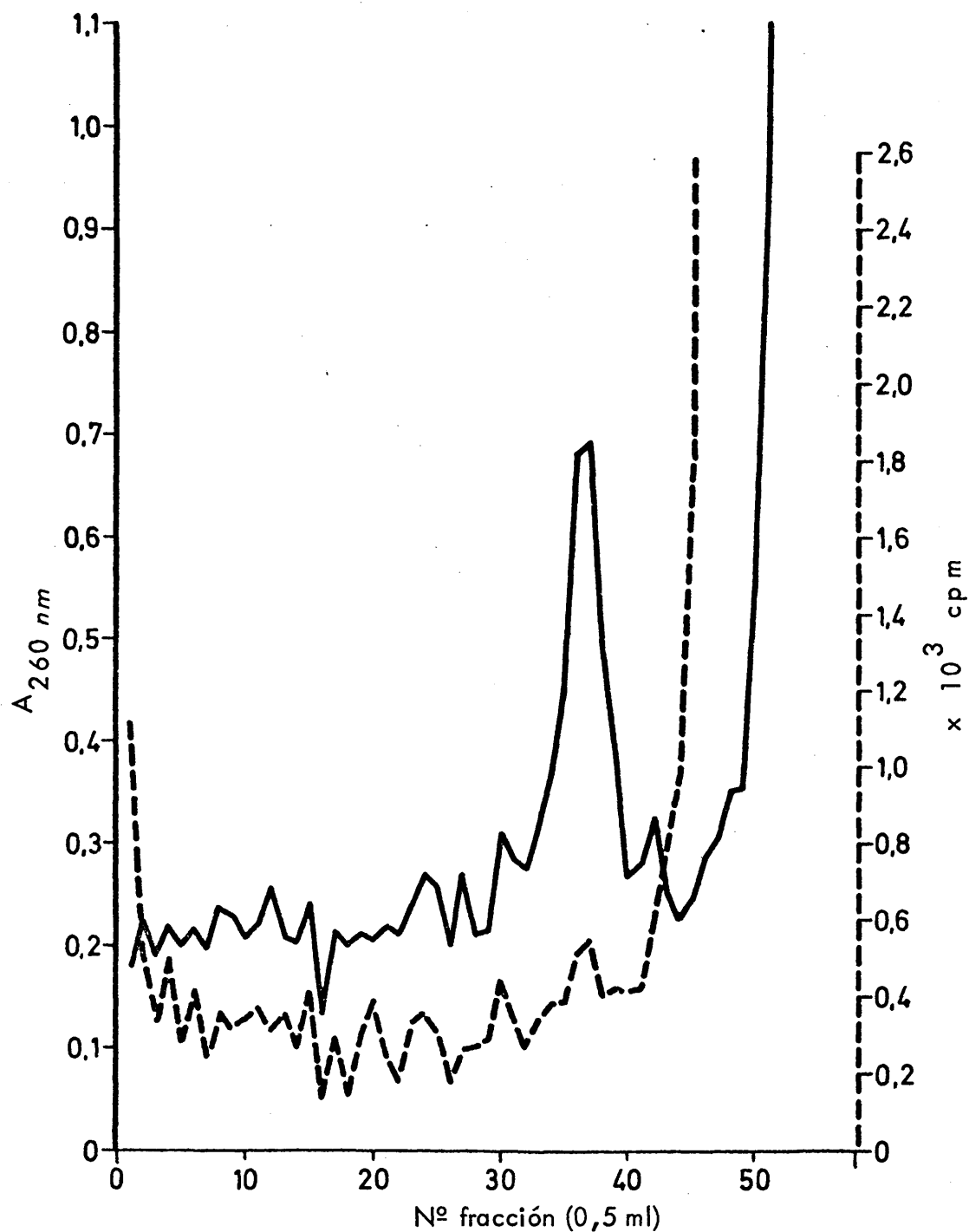


FIGURA 25.- Perfil producido al centrifugar en gradiente lineal de sacarosa la solución resultante de tratar la pella mitocondrial (10 000 x g) obtenida de la Figura 24, con 0,5% de Triton X-100 en BI-5.

TABLA - 22 - % ribosómico sedimentado junto con las mitocondrias Células CAEL "in vitro" homogeneizadas en BH-1				
Sobrenadante	Monosomas	Dímeros	Polisomas	Total ribosómico
postmitocondrial	7,9 %	25,7 %	37,2 %	70,8 %
Lavado pella 10.000 x g	3,2 %	9,4 %	16,6 %	29,2 %
Total en el sobrenadante postnuclear	11,1 %	35,1 %	53,8 %	100,0 %

En el sobrenadante postmitocondrial el 53 % de los ribosomas está en forma de polirribosomas (tabla 21). El resto son monosomas y dímeros. La actividad ligada a los polisomas es aproximadamente el 50 % del total, apareciendo el 30 % sobre los monosomas, lo que supone una cierta degradación de los polisomas. En el lavado de la pella la destrucción de polisomas a monosomas es mayor, aunque en este caso hay una cierta cantidad de aminoácidos libres contaminando la banda de los monosomas, ya que este sobrenadante no se purificó a través de gradiente discontinuo de sacarosa.

Refiriendo ambos gradientes al mismo número de células de partida, vemos que en la primera extracción se recogen el 71 % de los ribosomas contenidos en el sobrenadante postnuclear, sedimentando con las mitocondrias el 29 % restante (tabla 22). De este 71 %, el 37 % son polisomas, frente al 17 % encontrado en la extracción de la pella mitocondrial. No -aparecen polisomas de gran peso entre los sedimentados con las mitocon-drias; el pico más importante, después de los dímeros, es el de los tetráu

meros (figura 25). En el primer sobrenadante abundan sobre todo los pentámeros, hexámeros y heptámeros (figura 24). Si había más de al to peso molecular, es posible que hayan quedado unidos a los núcleos.

Uniendo estos datos a los obtenidos en el estudio de la pella nuclear podemos concluir:

- a) En la pella nuclear quedan aproximadamente el 30 % de los ribo mas totales, produciéndose una pequeña preferencia por los de 7 - unidades entre todos los polisomas.
- b) En la pella mitocondrial aparece aproximadamente el 30 % de los ribosomas contenidos en el sobrenadante postnuclear, es decir, un 20 % del crudo de partida, sin que se observe predominio de nin guna estructura.
- c) Después del proceso completo de purificación, se obtiene el 50 % de los ribosomas citoplásticos, con una ligera pérdida de partículas de 7 ó más unidades.

V.3.- DEGRADACION a través del TIEMPO de los POLIRIBOSOMAS AISLADOS.

Se observó que fraccionamientos realizados a partir del mismo sobrenadante postmitocondrial conservado a -20° C durante cierto número de días, daban perfiles de sedimentación diferentes.

En la figura 26 se ha representado este efecto.

El estudio cuantitativo (tabla 23) indica que al cabo de 7 días hay una degradación de polisomas a dímeros relativamente intensa. Pero lo que se produce en mayor medida es una degeneración de las estructuras, con formación de agregados inespecíficos de coeficientes de sedimentación - intermedios entre los de las estructuras normales. Hay un aumento de - subunidades, y en general, se pierde la separación nítida entre las zonas.

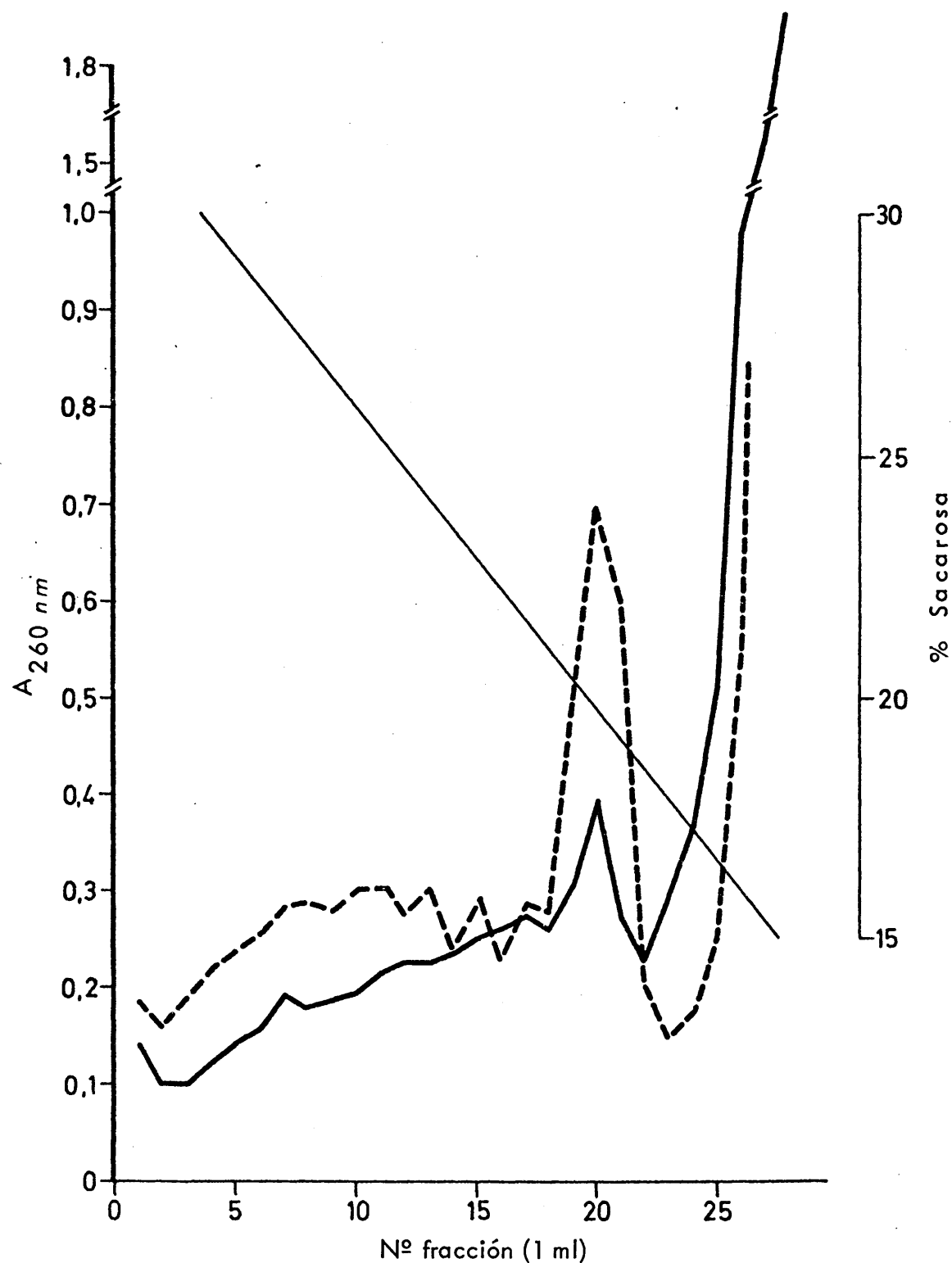


FIGURA 26.- Degeneración producida en los polisomas, una vez aislados de la célula, al mantenerlos a -20°C . Polirribosomas de células CAE "in vivo", homogeneizadas en BH-1 con émbolo de teflon. Sobrenadante postmitocondrial (10 000 xg) centrifugado en gradiente lineal de sacarosa (15-30%), 2 horas en rotor SB-110 de ultracentrifuga I.E.C. a 25 000 rpm (110 000 x g). Inmediatamente después de obtenerlo - - - - ; después de 7 días mantenido a -20°C _____

Por este motivo todos los experimentos se realizaron con material fresco, es decir, inmediatamente después de conseguir el sobrenadante postmitocondrial, o la pella ribosómica.

TABLA - 23 - Degeneración estructural a través del tiempo de los polisomas aislados y mantenidos a -20° C			
Tiempo a -20° C	Monosomas (% u.o)	Dímeros (% u.o)	Polisomas (% u.o)
0 días	$42,7 \pm 0,9$	$11,3 \pm 1,3$	$46,0 \pm 1,1$
7 días	$34,3 \pm 1,5$	$29,5 \pm 1,9$	$36,2 \pm 1,7$

VI.- ACTIVIDAD POLISOMICA

En la introducción de esta Memoria hemos expuesto los objetivos perseguidos al realizar el trabajo que nos ocupa. Se pueden resumir en dos puntos:

- 1) Análisis de la actividad polisómica en el tumor, considerado como conjunto de células cancerosas.
- 2) Análisis de la actividad ribosómica que se produce en la célula tumoral en particular, durante la fase S del ciclo.

Comenzaremos mostrando los polisomas aislados a partir del tejido tumoral (CAEL y CAE) en fase logarítmica de crecimiento, mantenido "in vitro", tomando como cultivo control el de células de embrión de ratón (ERGAN); a continuación, veremos los polisomas del tejido tumoral "in vivo", por lo que podremos deducir la influencia del sistema de cultivo; y en tercer lugar, observaremos la conducta polisómica durante la primera parte de la fase celular de síntesis de DNA.

Distinguiremos, a lo largo del estudio, entre polisomas libres y unidos a membranas del retículo endoplásmico.

VI.1.- CELULAS NORMALES y CANCEROSAS "IN VITRO"

Hasta aquí hemos mostrado cómo influyen las diferentes condiciones de aislamiento de polisomas aplicadas a los dos tipos celulares descritos.

Lo hallado nos llevó a elegir como técnica definitiva la de homogeneización con émbolo de teflon en medio hipotónico, purificando el sobrenadante postmitocondrial a través de un gradiente discontinuo de sacarosa.

Como hemos visto en el apartado V.1.3., en el que se compara este proceso con el de lisis química, se obtiene un perfil polisómico de valores máximos respecto a los polisomas. Por otra parte, permite separar polisomas libres de los unidos a membranas, usando un gradiente discontinuo de sacarosa. Este gradiente cumple la doble función de diferenciar entre ambos tipos de polisomas y purificarlos, eliminando sobre todo una gran parte de los restos proteicos marcados, que contaminaban la zona de pequeños coeficientes de sedimentación del gradiente, y que constituía un gran inconveniente a la hora de interpretar correctamente los datos.

Con motivo del estudio de la pella mitocondrial (apartado V.2.2), se ensayó la técnica completa; en la figura 24, podemos ver que se gana precisión en los límites de las zonas. También el fraccionamiento en alícuotas de 0,5 ml favorece la resolución del gradiente.

Otra de las ventajas de esta técnica es que el sobrenadante postmitocondrial, que se encuentra en medio hipotónico, se hace isotónico rápidamente, aumentando también la cantidad de Mg^{2+} , lo que impide, en gran medida, la destrucción de los polirribosomas. El gradiente lineal de sacarosa preparado en el buffer isotónico (de fuerza iónica media y relación de cationes 150:10) mantiene más fijas en su lugar las bandas, una vez ultracentrifugado, por lo que la difusión entre zonas es menor.

Vamos a ver cuales son las características de los polisomas aislados de esta manera, a partir de células normales y cancerosas, recopilando la mayor cantidad posible de datos.

VI.1.1.- Polisomas totales y libres de ERGAN

Para realizar este estudio se partió de 30 frascos de Rous sembrados con 150.000 células/ml. Se tripsinizaron en fase logarítmica de crecimiento y a continuación se incubaron en medio R5a con 10 % de suero de ternera, un mínimo de 2 horas y un máximo de 3,5 horas,* en suspensión - para evitar adherencias celulares al vidrio, consiguiendo al mismo tiempo la recuperación de la actividad funcional, alterada con la tripsinización.

El aislamiento de polirribosomas se realizó como se ha descrito en Materiales y Métodos; después de un pulso de 5 minutos con hidrolizado proteico $[^{14}C]$ de 30 $\mu Ci/ml$ a una suspensión de 50×10^6 células/ml,

* Este tiempo se consideró suficiente a partir de los datos suministrados por varias cinéticas de incubación realizadas con células en suspensión después de tripsinizadas; la viabilidad celular se siguió por recuento en presencia de eritrosina.

se dió un choque hipotónico de 10 minutos en BH-1, se homogeneizaron durante 1 minuto y 40 segundos en el punto 3 del motor con homogeneizador vidrio-teflón, y se continuó siguiendo la técnica indicada - para obtener polisomas totales y libres.

Los gradientes discontinuos del sobrenadante postmitocondrial tratado con 1,0 % de Triton X-100, y del no tratado, presentaban aspectos marcadamente diferentes.

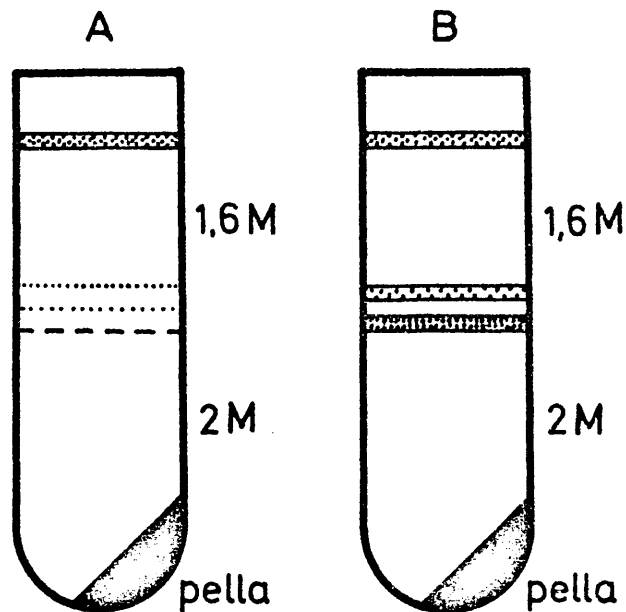
En el esquema 6, se han representado ambos. En el tubo del sobrenadante no tratado (tubo B) con detergente, se aprecian una o dos bandas (a menudo se funden en una sola ancha), al final de la fase 1,6 M. - Las dos bandas se recogieron juntas para ser estudiadas en gradiente lineal de sacarosa al mismo tiempo que las pellas polirribosómicas sedimentadas en cada tubo, guardándose hasta entonces a -20° C.

En el fondo de ambos tubos de gradientes discontinuos, se encuentra una pella translúcida, que se disuelve en el BI-4, una vez retirado completamente el sobrenadante de sacarosa.

Después de eliminar los agregados inespecíficos por centrifugación a $3.000 \times g$, se coloca 1 ml de sobrenadante sobre gradientes lineales de sacarosa previamente preparados. No siempre fue posible ajustar la D.O de la carga a 25 ó 30 u.o./ml, ya que las cantidades de material obtenidas eran muy variables; por este motivo el perfil de sedimentación se ha tomado como dato cualitativo para cada línea celular, y, como dato cuantitativo característico de la línea, el valor medio * de los porcentajes de cada banda frente al total ribosómico.

En las figuras 27 y 28 se muestra el perfil de sedimentación en gradiente lineal de sacarosa, presentado por polisomas totales y libres respectivamente

* Valor medio de 3 ó más experimentos



ESQUEMA 6.- Separación de polisomas libres de los unidos a membranas citoplásmicas, por medio de un gradiente discontinuo de sacarosa (1,6 M/2,0 M) Centrifugación a 120.000 xg durante 18 horas.

A : spm tratado con Triton X-100

B : spm no tratado con detergente.

Las bandas que aparecen en la interfase de B corresponden a membranas citoplásmicas del retículo liso y rugoso (a éstos permanecen unidos los polisomas). Las pellas del fondo del tubo están constituidas por el total ribosómico y polisómico contenido en el spm en el caso del tubo A, y en el caso del tubo B, exclusivamente por los polisomas y ribosomas no unidos a membranas de retículo endoplásmico, ya que los unidos quedan en la interfase.

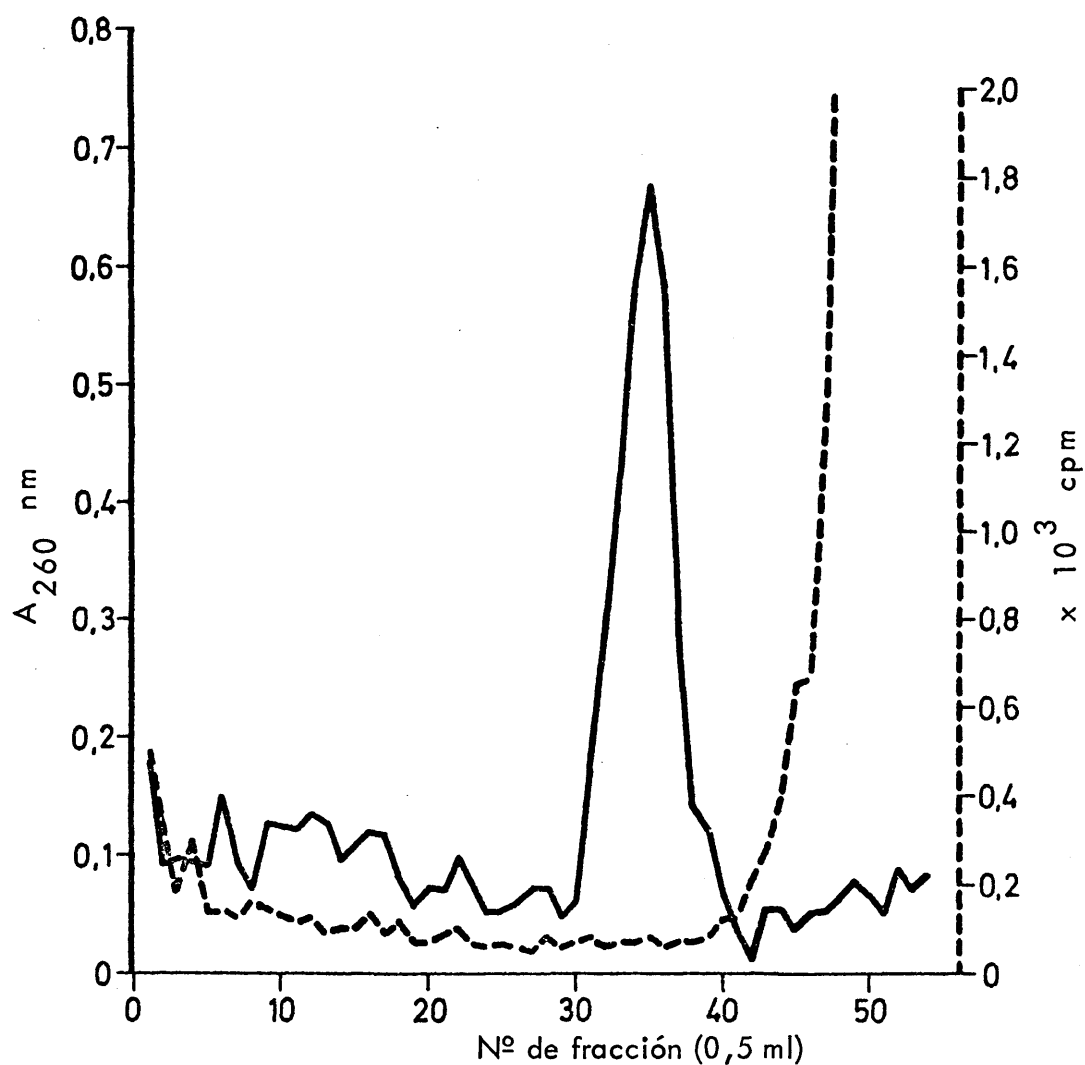


FIGURA 27.- Ribosomas citoplásmicos totales de ERGAN. Células homogeneizadas mecánicamente (vidrio-teflon) en BH-1. Sobrenadante de 10.000 x g tratado con 1,0% de Triton X-100 en BI-4, centrifugado 18 horas a 120.000 x g a través de gradiente discontinuo de sacarosa (1,6M/2,0 M). Pella polisómica resuspendida en BI-4 (21 u.o. en 1 ml) se coloca sobre un gradiente lineal de sacarosa (15-10%) y se centrifuga 2 horas a 110.000 x g en SB-110 de B-60 (I.E.C.)

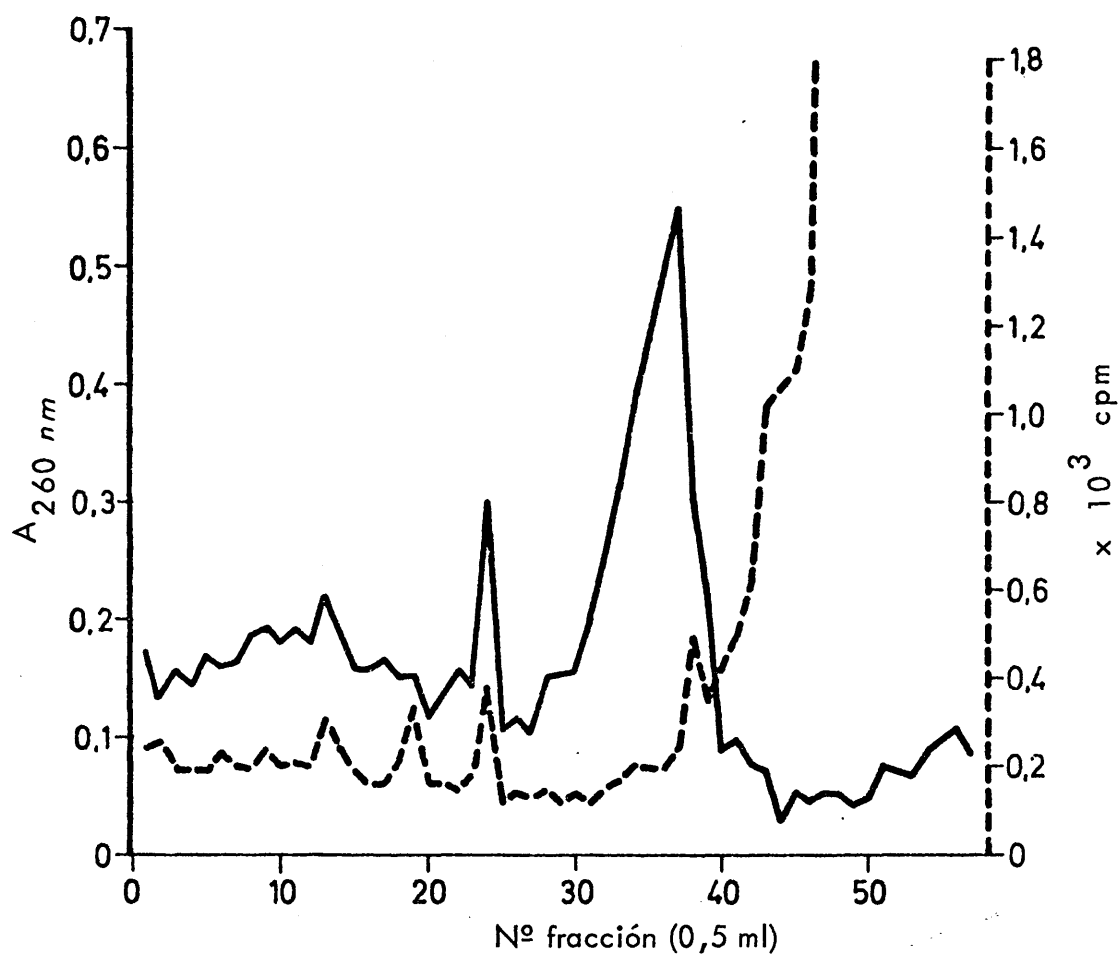


FIGURA 28.- Ribosomas libres en el citoplasma de células ERGAN. Se aplica la técnica descrita en la Figura 27, excepto el tratamiento con Triton X-100. El gradiente lineal se carga con 17 u.o. en 1 ml.

te del citoplasma de células ERGAN al séptimo día de cultivo.

En la figura 27, se observa un pico elevado en las fracciones 30-42(máximo en la 35), correspondiente a los ribosomas existentes libres y ligados a membranas, no portadores de polipéptidos nacientes; por la zona del gradiente en que aparecen, pueden ser dímeros y monómeros solapados. No es probable que sean producto de la rotura de polirribosomas de alto peso molecular causada por manipulaciones bruscas o poco adecuadas, ya que no presentan actividad isotópica.

A la derecha aparecen las subunidades y a la izquierda los trímeros (fracciones 25 a 29), tetrámeros (máximo en fracción 22), pentámeros (máximo en la 16,17); los de 6 y 7 unidades suelen aparecer en una banda ancha, que, en este caso, corresponde a las fracciones 8 a 14, y a continuación se encuentran los polímeros de 8, ó más, quedando en las fracciones 1 y 2 grandes polirribosomas que al microscopio electrónico presentan aspecto de estar formados por la unión de varios de 7 u 8 unidades.

El perfil presentado en la figura 28, corresponde a los polirribosomas libres. Como vemos, este grupo es rico en ribosomas monoméricos y dímeros (ambos aparecen totalmente unidos en una sola zona de la fracción 30 a la 40), así como en tetrámeros (fracción 24) y polisomas de 5 y 6 unidades (fracciones 13 y 19). En los de 4, 5 y 6 unidades aparece una mayor actividad de síntesis proteica. Por otra parte, es posible que se haya producido una ligera rotura de polisomas, ya que hay un pico de radiactividad en la fracción 38 correspondiente a monómeros.

En la tabla 24, se han reunido los valores relativos de cada banda respecto del total, tomándose los datos de absorción a 260 nm en cada fracción. También se ha calculado la actividad específica de cada banda expresándose en 10^3 cpm/u.o.

Si tenemos en cuenta: a) que el aislamiento de polisomas se ha hecho partiendo de una misma suspensión celular; b) que de la mitad del spm

TABLA - 24 - Polisomas totales y libres de Células ERGAN				
Análisis del gradiente lineal de sacarosa				
Bandas	Polisomas totales		Polisomas libres	
	% *	10^3 cpm/u.o.	%	10^3 cpm/u.o.
Monosomas y Dímeros (Frac. 30-42)	$55,3 \pm 2,5$	$0,3 \pm 0,09$	$39,3 \pm 2,9$	$0,7 \pm 0,08$
Trímeros (Frac. 25-30)	$5,6 \pm 1,5$	$1,1 \pm 0,1$	$9,2 \pm 1,6$	$0,9 \pm 0,07$
Tetrámeros (Frac. 20-25)	$6,6 \pm 1,5$	$1,1 \pm 0,1$	$11,1 \pm 1,6$	$1,1 \pm 0,09$
Pentámeros (Frac. 15-20)	$9,1 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0,08$	$10,4 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,09$
Hexámeros y Heptámeros (Frac. 7-15)	$12,6 \pm 2,0$	$1,1 \pm 0,09$	$19,2 \pm 1,5$	$1,0 \pm 0,1$
Alto peso molecular (Frac. 2-7)	$10,8 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,1$	$10,7 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,09$
Polisomas en conjunto (Frac. 2-30)	$44,7 \pm 1,9$	$1,3 \pm 0,09$	$60,7 \pm 1,8$	$1,1 \pm 0,1$

* Se toma como total de los polisomas existentes la D.O. registrada en el gradiente lineal desde la fracción 2 a la 42, es decir, no se toma en cuenta la absorción debida a subunidades y carga del gradiente.

resultante, tratado con Triton X-100, obtenemos los polisomas totales (es decir, los libres más los unidos a membranas) del citoplasma celular; y c) que de la otra mitad del spm, sólo tomamos los polisomas - libres; podemos expresar ambos contenidos polisómicos en u.o./10⁸ células, compararlas entre sí, y deducir la cantidad absoluta de polisomas libres o ligados a membranas que existen en la línea celular.

En la tabla 25, se muestra el resultado de los cálculos realizados. De ellos se desprende que en estas células todos los polisomas, y en general los ribosomas, son libres. Esta conclusión coincide con las halladas para embrión de ratón, a través de otras técnicas, y que se encuentran descritas en la bibliografía (13).

TABLA - 25 - Contenido ribosómico de células ERGAN (u.o./10 ⁸ células)	
Polisomas totales	Polisomas libres
3,8 ± 0,2	3,9 ± 0,2

VI.1.1.1.- Estudio de las bandas del gradiente discontinuo

Estas bandas corresponden a las membranas del retículo endoplásmico liso y rugoso; su densidad no les permite atravesar la fase de sacarosa 2 M, por lo que quedan detenidos al final de la 1,6 M (ver esquema 6).

Si, como se deduce por los cálculos efectuados, las células ERGAN tienen todos los ribosomas libres en el citoplasma, estas membranas deben ser exclusivamente de retículo liso. Para verificar estas deducciones se estudiaron las bandas recogidas del gradiente discontinuo, utilizando el mismo gradiente que para los polisomas.

Se tomaron con pipeta y se llevó la solución a 15 % en sacarosa con BI-5. A continuación, se trató con Triton X-100 1,0 % (concentración final) durante 5 a 10 minutos a 4° C, con lo que se solubilizaron las membranas, y después de eliminar agregados inespecíficos, la solución se puso sobre un gradiente lineal de sacarosa del 15 al 30 % (p/p). Se centrifugó como de costumbre una vez fraccionado, la D.O a 260 nm y la actividad ^{14}C presentaron el aspecto dibujado en la figura 29.

El perfil de D.O. registra algunos máximos, siendo el más importante el de la fracción 18, de 0,26 u.o., que corresponde a polisomas de 5 ó 6 unidades. El marcado isotópico no coincide con los máximos de D.O., y por otra parte, es muy bajo respecto al registrado en los polisomas del aislamiento correspondiente (figuras 27 y 28).

Todo indica que realmente no hay, o hay muy pocos, polisomas ligados a retículo en estas células de embrión de ratón, mantenidas "in vitro" y establecidas como cultivo en monocapa.

VI.1.2.- Polisomas libres y unidos a membranas en células CAEL "in vitro"

La diferenciación entre ambos tipos de polisomas se hizo igual que en el caso anterior de ERGAN.

En las figuras 30 y 31 se han representado las lecturas a 260 nm, así como la actividad de síntesis registrada en cada fracción. El gradiente correspondiente al total ribosómico (figura 30) muestra las zonas de monosomas (fracciones 41 a 44) y dímeros solapados en parte (fracciones 30 a 41); el resto de los polisomas aparecen perfectamente separados según estructuras. Se aprecian los picos debidos a subunidades en las fracciones 46 y 52.

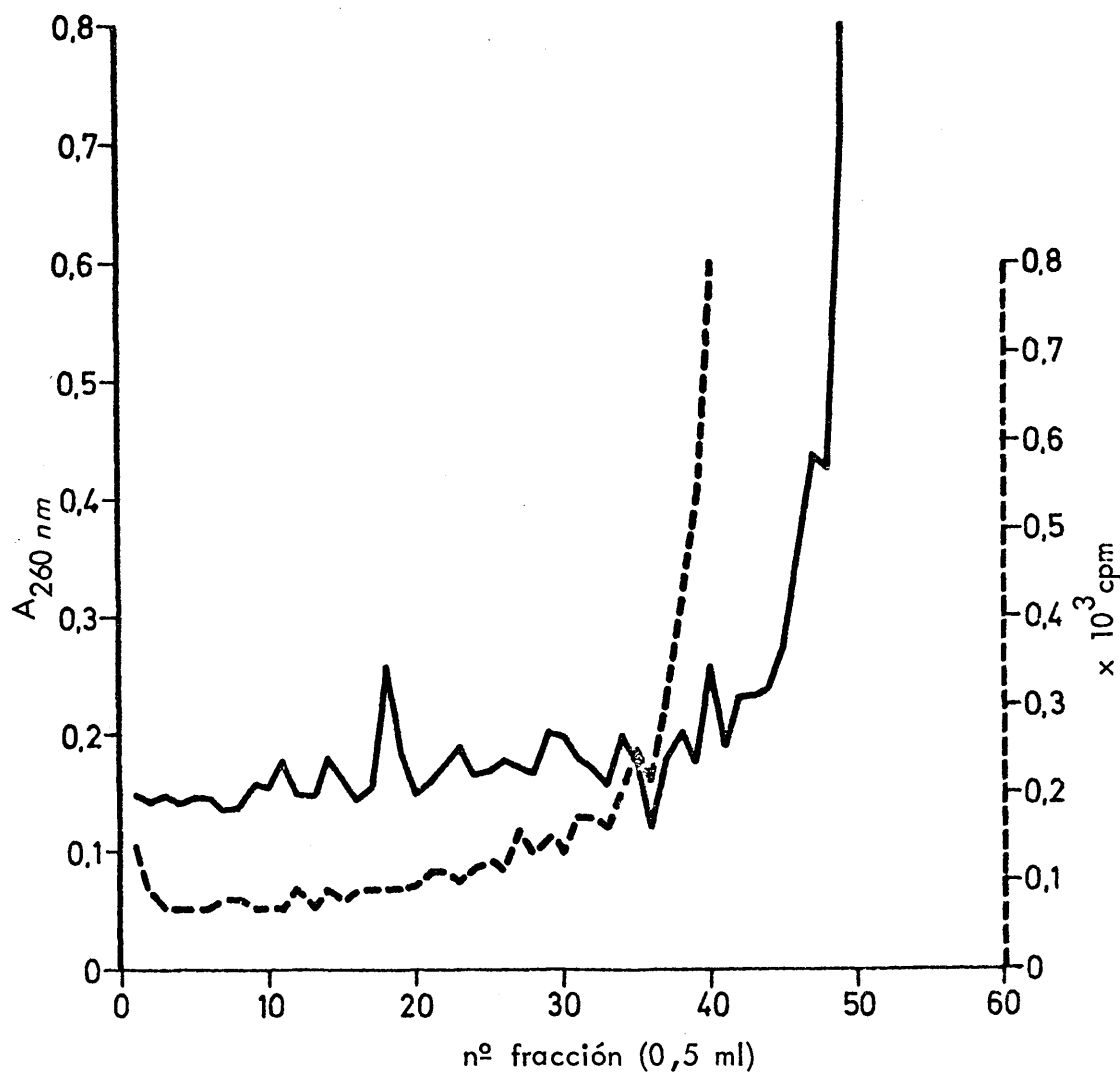


FIGURA 29.- Estudio de las bandas aparecidas en la interfase del gradiente discontinuo de sacarosa (1,6 M/2,0 M) al centrifugar el spm sin tratar con Tritón X-100 Células ERGAN.

Las bandas se recogen y se tratan con Triton X-100 al 1,0 % en BI-5. La solución se coloca sobre un gradiente lineal de sacarosa y se procede como habitualmente en este trabajo.

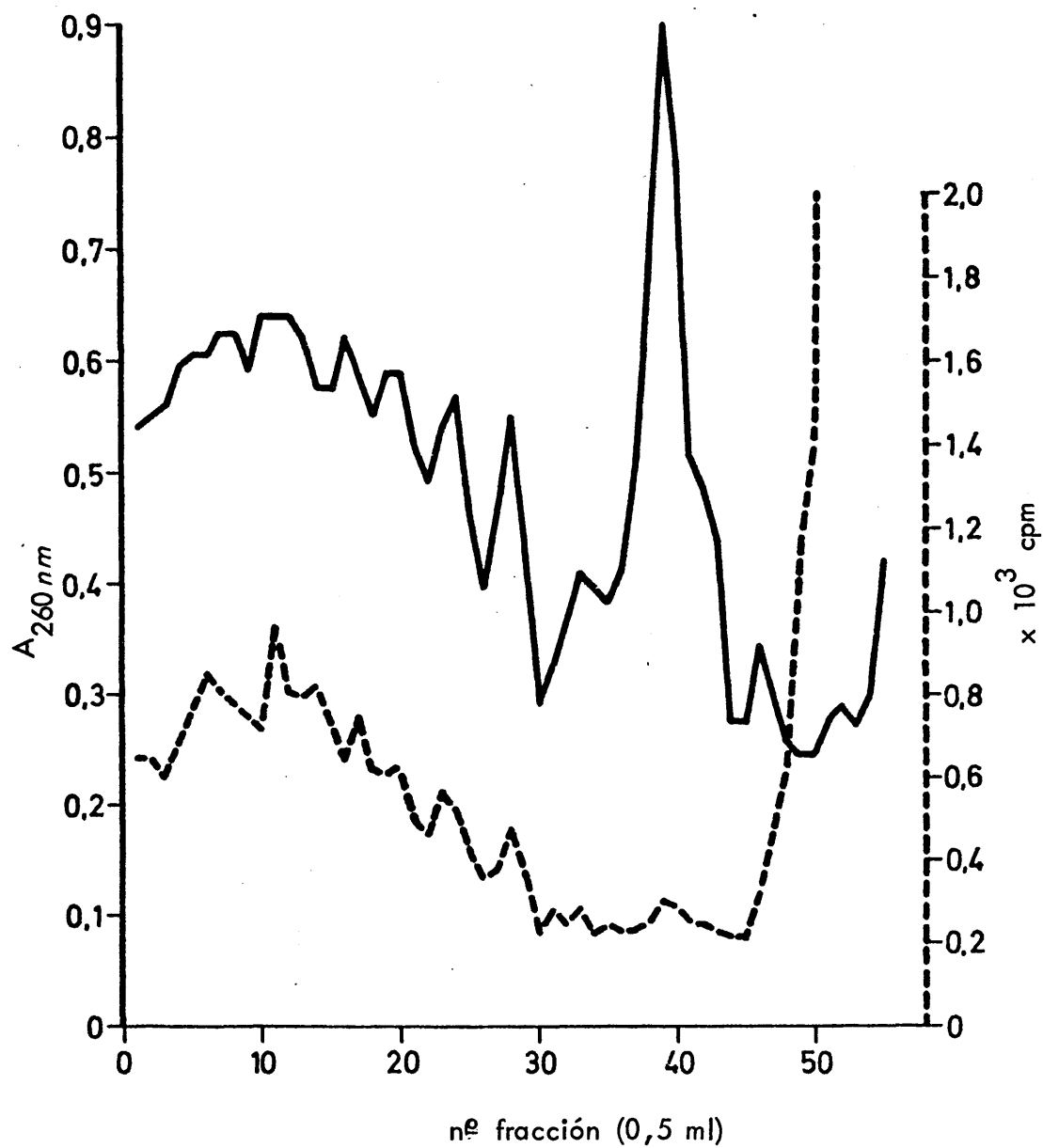


FIGURA 30.-Polisomas citoplásmicos totales de células CAEL "in vitro".
El gradiente lineal se cargó con 30 u.o. en 1 ml de solución.

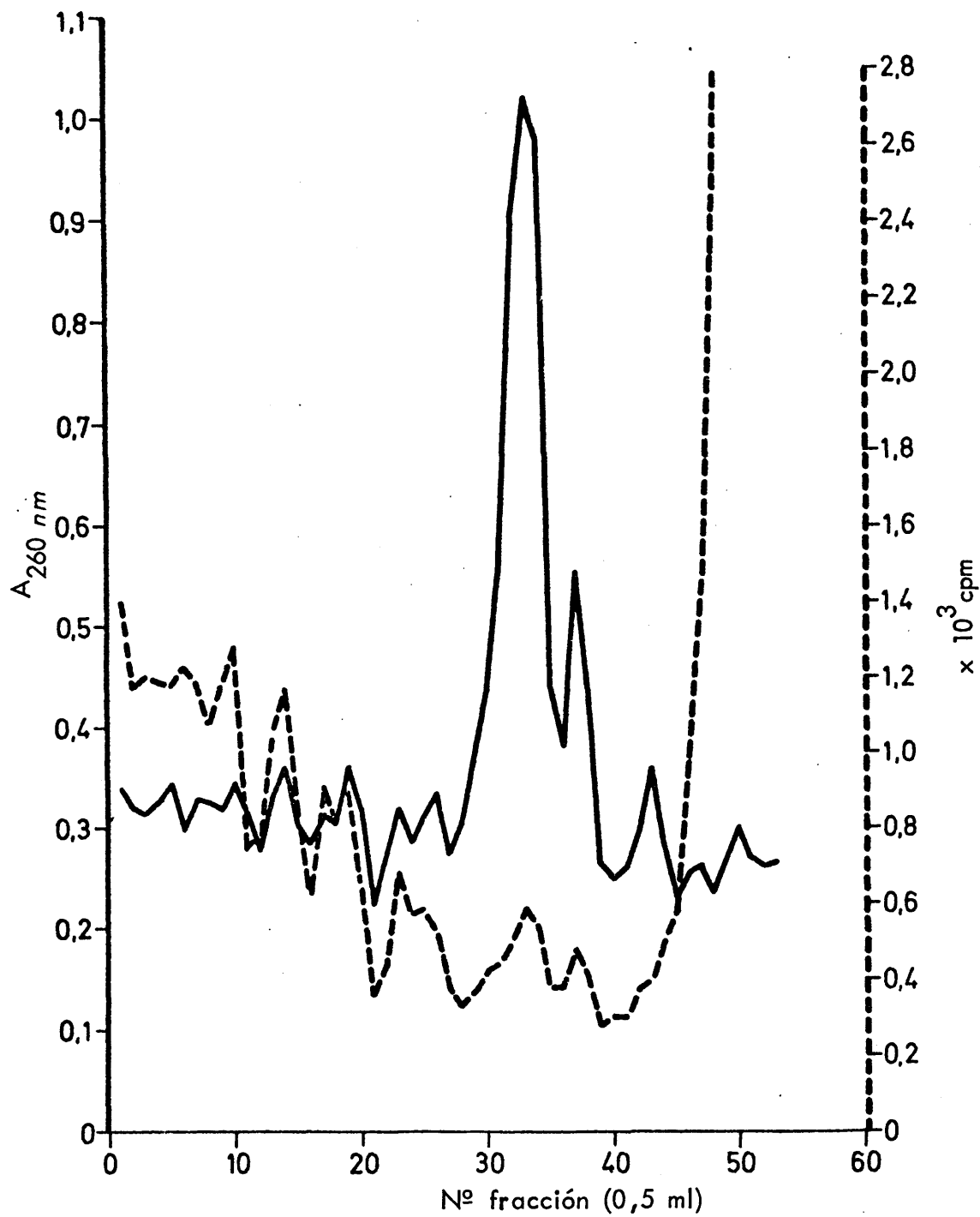


FIGURA 31.-Polisomas libres (no unidos a membranas del retículo endoplásmico) de células CAEL "in vitro". Carga del gradiente lineal 20 u.o. en 1 ml.

En el caso de polisomas libres (figura 31), los monómeros se han separado mejor de los dímeros, y se ven dos picos independientes: monómeros con el máximo en la fracción 37, y los dímeros en la 33. El resto aparece bien definido, excepto los polisomas de 6 y 7, cuyas bandas (fracciones 6 a 12) se encuentran ligeramente unidas.

Estudiando detenidamente los picos de dímeros y monosomas de todos los fraccionamientos realizados con las células ascíticas no hemorrágicas, se ve que, en los casos en los que los monosomas se separan con nitidez, éstos son poco numerosos. En otros experimentos son los dímeros los que aparecen claramente diferenciados en un pico que tampoco es el de máximo valor de absorción a 260 nm. Ejemplo de este hecho son las figuras 30 y 31: en la primera, los dímeros ocupan la zona de las fracciones 30 a 35 y los monosomas aparecen como un hombro a la derecha del máximo. En la segunda figura, son los monómeros los que aparecen separados en la zona de las fracciones 26 a 40, quedando los dímeros casi totalmente cubiertos por el máximo.

Esto, unido al cálculo del coeficiente de sedimentación, nos hizo suponer la presencia de una estructura de peso molecular intermedio entre los dímeros y monómeros, que, existiendo en gran cantidad, solapa a unos u otros según pequeñas variaciones en las condiciones de ultracentrifugación y fraccionamiento.

Observando directamente al microscopio electrónico muestras tomadas del pico máximo, se pudo apreciar que está constituido por grupos de un monómero asociado con una subunidad ribosómica; en general, es la subunidad grande de los ribosomas, aunque en algunos casos parecía ser la pequeña. Por ser una estructura estable y que aparece sistemáticamente en estas células cancerosas (como iremos viendo) se puede denominar como "dímero incompleto".

Como no siempre son claros los límites de su zona en el gradiente, se une

TABLA -26 - Polisomas totales y libres de células CAEL "in vitro"

Análisis del gradiente lineal de sacarosa				
Bandas	Polisomas totales		Polisomas libres	
	%	10^3 cpm/u.o.	%	10^3 cpm/u.o.
Monosomas (Frac.41-44)	$9,2 \pm 0,6$	$1,18 \pm 0,05$	$10,4 \pm 0,7$	$1,21 \pm 0,05$
Dímeros (Frac.30-41)	$29,9 \pm 2,2$	$0,84 \pm 0,07$	$31,9 \pm 2,1$	$0,75 \pm 0,07$
Trímeros (Frac.25-30)	$12,1 \pm 0,7$	$1,57 \pm 0,09$	$11,7 \pm 0,6$	$1,65 \pm 0,06$
Tetrámeros (Frac.20-25)	$9,2 \pm 0,1$	$1,97 \pm 0,09$	$10,2 \pm 0,2$	$2,41 \pm 0,09$
Pentámeros (Frac.17-20)	$8,9 \pm 0,2$	$2,26 \pm 0,18$	$10,1 \pm 0,4$	$2,82 \pm 0,18$
Hexámeros (Frac.13-17)	$6,7 \pm 1,1$	$2,10 \pm 0,20$	$14,1 \pm 1,5$	$3,40 \pm 0,20$
Heptámeros (Frac.9-13)	$10,0 \pm 1,7$	$2,37 \pm 0,20$		
Elevado peso molecular (Frac.1-9)	$14,0 \pm 1,3$	$2,59 \pm 0,20$	$11,6 \pm 1,1$	$3,84 \pm 0,25$
Total de polisomas (Frac.1-41)	$90,8 \pm 1,6$	$2,25 \pm 0,20$	$89,6 \pm 1,40$	$3,1 \pm 0,19$

a los dímeros en el momento de calcular los valores relativos de cada estructura, ya que aparece solapando a éstos con más frecuencia. La cantidad de material detenido en cada zona del gradiente de la figura 30 (polisomas totales) respecto al total (tabla 26), indica que el 65% corresponde a polisomas de 3 ó más unidades. Este 65 % se encuentra repartido, casi por igual, entre las estructuras apreciables. El máximo, un 14 %, corresponde a la zona final del gradiente (fracciones 1 a 9), en la que aparecen acúmulos de polisomas de tamaño muy difícilmente determinable.

En el perfil correspondiente a polisomas no ligados a membranas, se aprecia una distribución en estructuras muy semejante; hay un ligero aumento de dímeros (alcanzan el 32% frente al 30% del gradiente paralelo; ver tabla 26), y disminuyen los polisomas de alto peso molecular en igual proporción. Esta variación se debe a degradación de los grandes polirribosomas, como corrobora la presencia de actividad isotópica en las fracciones correspondientes a dímeros y ribosomas (figura 31).

El número de ribosomas libres aislados por 10^8 células de partida, es -- igual al total ribosómico celular; es decir, como en las células ERGAN, en las CAEL "in vitro" los ribosomas no están ligados a membranas (ver tabla 27).

<div>TABLA -27-</div> <div>Contenido ribosómico de células CAEL "in vitro" (u.o./10^8 células)</div>	
Total ribosómico	Ribosomas libres
7,3 \pm 0,2	7,1 \pm 0,2

Esta deducción se confirma al estudiar las bandas interfásicas del gradiente discontinuo del spm no tratado con detergente. Como en el caso de las células ERGAN, no se registran polisomas.

VI.1.3.- Polisomas libres y unidos a membranas en células CAE "in vitro"

Se hizo un doble estudio siguiendo dos rutas diferentes ya descritas:

- 1) Lisis con Tritón X-100 en medio isotónico BI-4, con lo que se obtiene el total ribosómico de las células.
- 2) Homogeneización BH-1, diferenciando entre polisomas libres y ligados a retículo endoplásmico por medio de un gradiente discontinuo de sacarosa.

Vamos a ver los resultados obtenidos de cada técnica.

VI.1.3.1.- Lisis en BI-4 con Tritón X-100 al 0,5% (concentración final).

Se tomaron 16 tubos del cultivo en fase logarítmica de crecimiento. 4 horas antes de comenzar el aislamiento se cambió el medio. El marcado de polipéptidos nacientes se hizo como en el caso de las mismas células "in vivo", es decir, dando un pulso de 3 minutos con hidrolizado proteico $[^{14}\text{C}]$ de 3 $\mu\text{Ci/ml}$ a una suspensión de 100×10^6 células/ml. El resultado es un pobre marcado, por lo que no se considera (figura 32). Es necesario aumentar veinte veces la concentración de $[^{14}\text{C}]$ para obtener en las células CAE "in vitro" un marcado similar al obtenido en las mismas células mantenidas "in vivo". Este fenómeno se explica teniendo en cuenta que el líquido ascítico es pobre en aminoácidos, siendo,

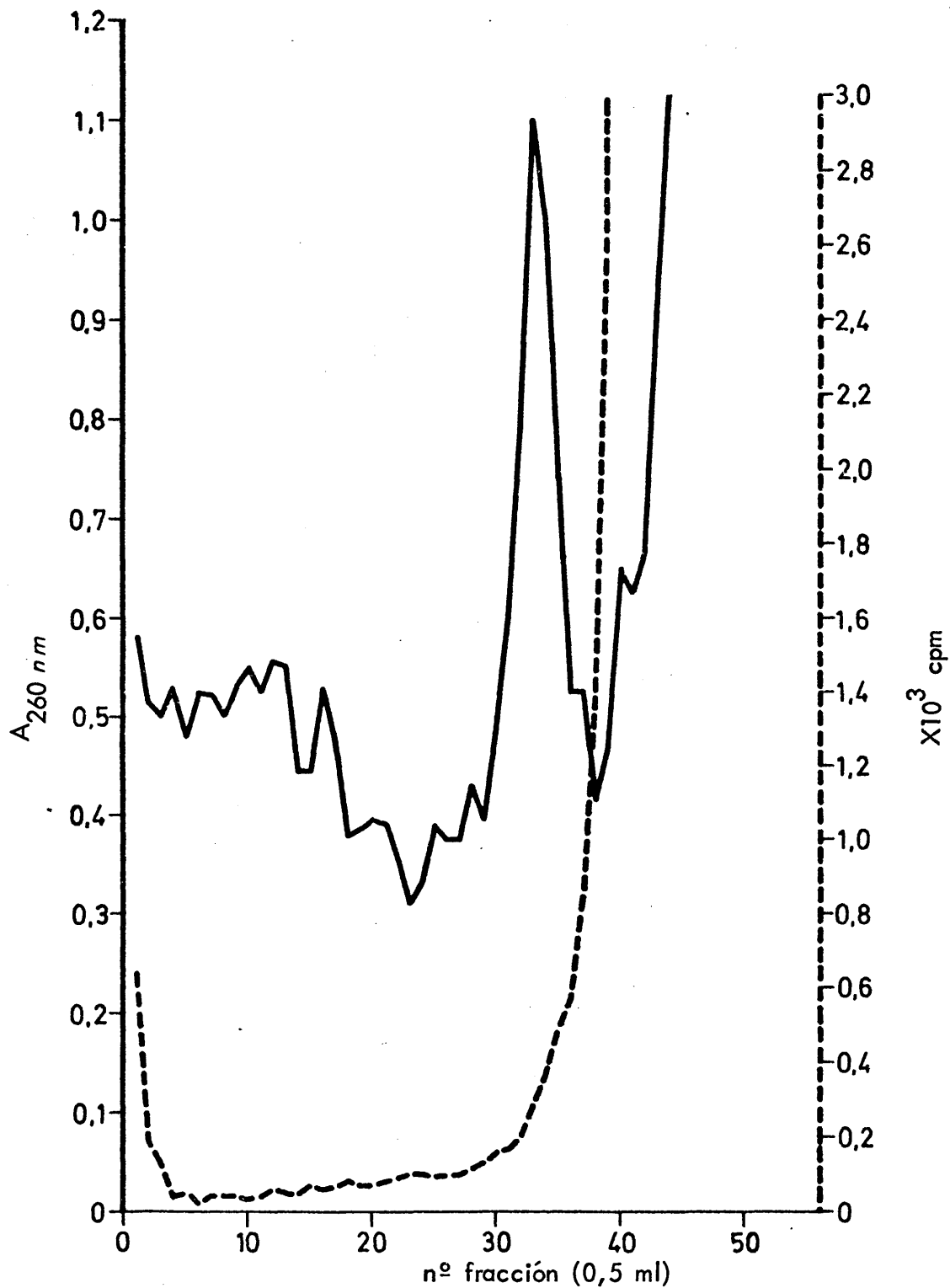


FIGURA 32.- Polisomas de células CAE "in vitro" aislados por lisis celular con Tritón X-100 al 0,5 % (conc, final) en BI-4. Marcado insuficiente ($3 \mu\text{Ci/ml}$ de hidrolizado proteico [^{14}C], 3 minutos a 37°C). El sobrenadante de $700 \times g$ se coloca directamente sobre el gradiente lineal de sacarosa.

por el contrario, muy rico en ellos el medio de cultivo B suplementado con 20 % de suero de ternera. *

Después de lisar las células se centrifuga el crudo a 700 x g y el sobrenadante postnuclear se fracciona en gradiente lineal de sacarosa.

Las lecturas a 260 nm y las determinaciones de ^{14}C se han representado en la figura 32. El marcado isotópico es bajísimo. Las bandas correspondientes a monosomas y dímeros aparecen solapadas formando una sola, ancha, cuyo máximo está en la fracción 33, teniendo una concentración de 1,1 u.o./ml.

Las cantidades relativas de cada banda frente al total se han recogido en la tabla 28.

El rendimiento obtenido de esta forma es de 20,0 u.o./ 10^8 células.

VI.1.3.2.- Ribosomas libres y unidos a retículo endoplásmico.

Para diferenciar ambos sistemas ribosómicos se siguió la técnica aplicada a las células ERGAN y CAEL "in vitro".

El marcado se hizo dando un pulso de 5 minutos con 30 $\mu\text{Ci/ml}$ de hidrolizado proteico ^{14}C a 50×10^6 células/ml.

La D.O. de ambos gradientes de sedimentación, así como la actividad isotópica, nos muestran (figuras 33 y 34) distribuciones polisómicas muy similares tanto cualitativa como cuantitativamente (ver tablas 29 y 30).

* En células ERGAN (figuras 22 y 23) nos ocurre el mismo fenómeno; las células en cultivo están saturadas de aminoácidos por lo que absorben los marcados con ^{14}C lentamente y en pequeña cantidad.

TABLA -28- Polisomas totales de células CAE "in vitro", lisadas con Triton X-100 en BI-4		
Análisis del gradiente lineal de sacarosa		
Bandas	%	10^3 cpm/u.o.
Monosomas y Dímeros (Frac.29-38)	34,3	No se considera (ver texto)
Trímeros (Frac.23-29)	11,2	
Tetrámeros (Frac.18-23)	10,7	
Pentámeros (Frac.14-18)	9,7	
Hexámeros y Heptámeros (Frac. 8-14)	17,2	
Acúmulos (Frac. 2-8)	17,0	
Total de polisomas (Frac. 2-29)	65,7	

Vemos que el máximo (fracciones 32 a 42) aparece dividido en dos picos en ambas figuras. El cálculo de los coeficientes de sedimentación así como la observación directa de éstos, y las demás bandas, al microscopio electrónico, indican claramente que se trata de monómeros en el pico menor (fracciones 38 a 42), y dímeros principalmente en el mayor (fracciones 31 a 38) mezclados con los "dímeros incompletos",

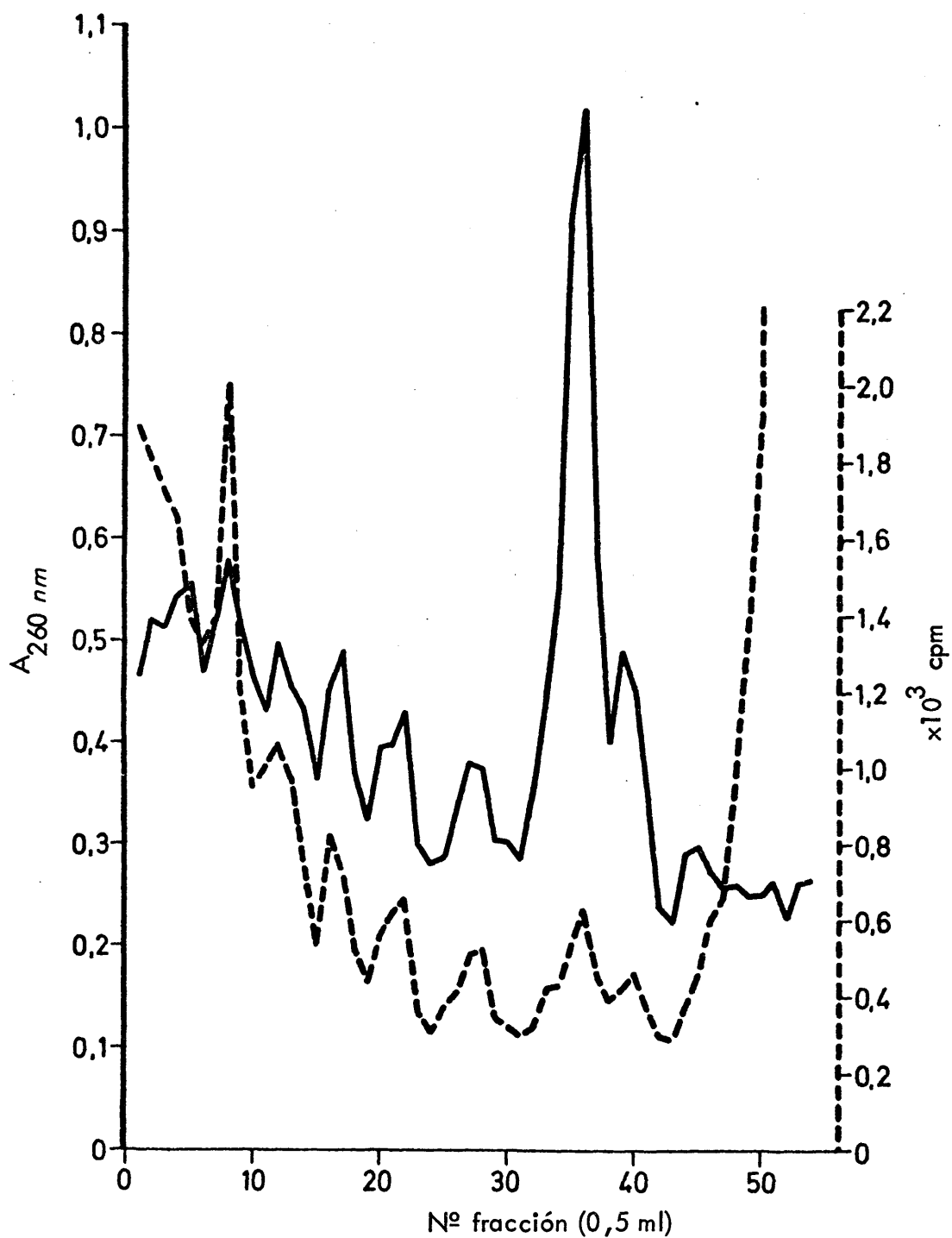


FIGURA 33.- Polisomas citoplásmicos totales de células CAE "in vitro". Marcado dando un pulso de 5 minutos con 30 /ml de hidrolizado proteico C a 50 x 10 células/ml. Técnica de aislamiento como la aplicada a ERGAN y CAEL "in vitro".

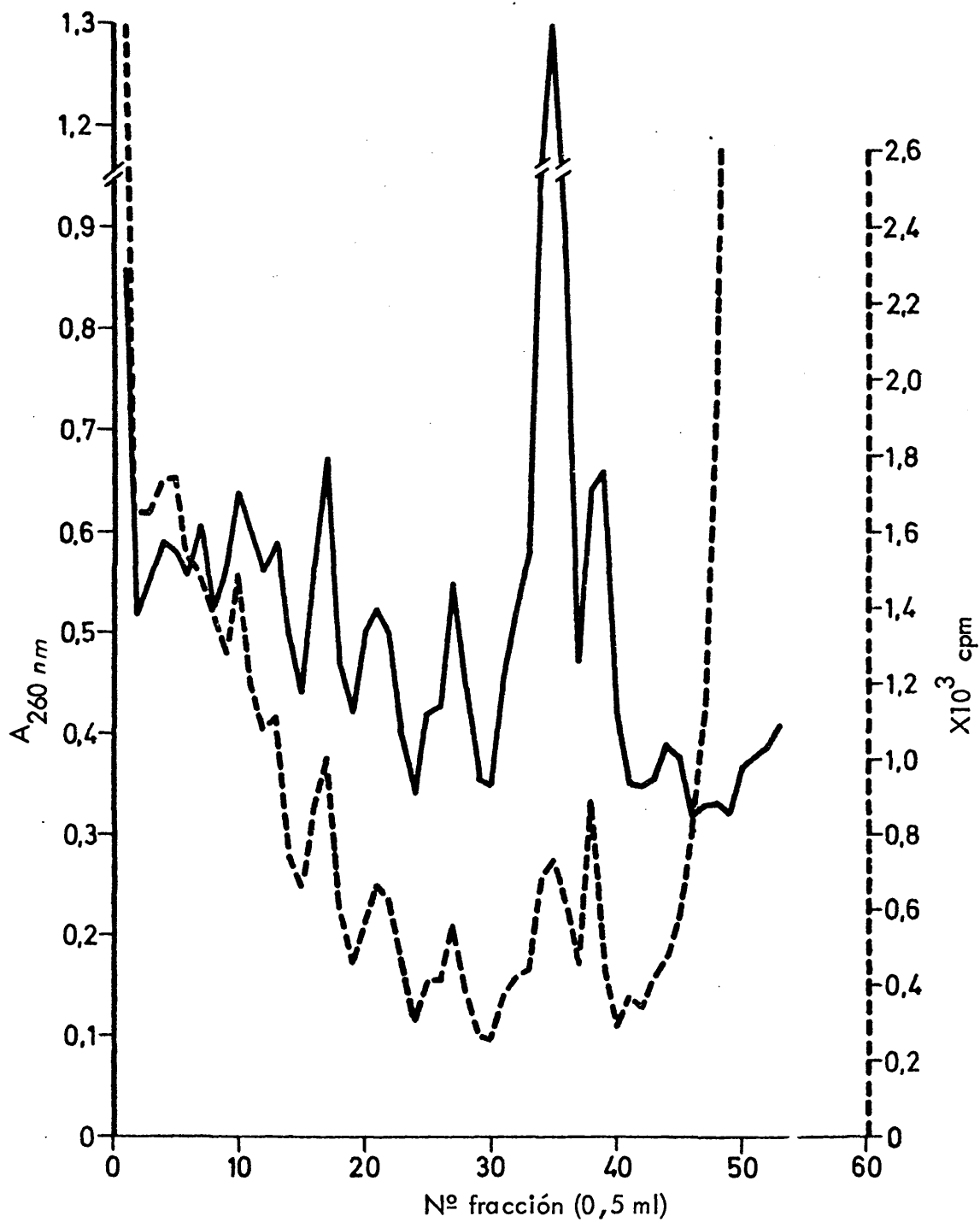


FIGURA 34.- Polisomas citoplásmicos libres de células CAE "in vitro". Se aplica la misma técnica que a las ERGAN y CAEL "in vitro".

que ya hemos descrito en las células CAEL "in vitro".

Las cantidades relativas de polisomas, frente a monosomas, son elevadas en ambos casos (ver tabla 29), y prácticamente iguales. La distribución según pesos moleculares muestra asimismo un marcado paralelismo.

TABLA-29- Polisomas totales y libres de células CAE "in vitro"				
Análisis del gradiente lineal de sacarosa				
Bandas	Polisomas totales		Polisomas libres	
	%	10^3 cpm/u.o.	%	10^3 cpm/u.o.
Monosomas (Frac. 38-43)	$10,1 \pm 0,7$	$1,03 \pm 0,10$	$11,6 \pm 0,7$	$0,97 \pm 0,09$
Dímeros (Frac. 31-38)	$21,4 \pm 0,9$	$0,76 \pm 0,06$	$22,1 \pm 0,7$	$0,72 \pm 0,07$
Trímeros (Frac. 24-31)	$12,0 \pm 0,2$	$1,21 \pm 0,02$	$11,6 \pm 0,2$	$0,90 \pm 0,01$
Tetrámeros (Frac. 19-24)	$8,5 \pm 1,1$	$1,64 \pm 0,02$	$10,8 \pm 1,0$	$1,15 \pm 0,02$
Pentámeros (Frac. 15-19)	$9,4 \pm 0,6$	$1,52 \pm 0,09$	$10,3 \pm 0,4$	$1,40 \pm 0,09$
Hexámeros (Frac. 11-15)	$10,2 \pm 1,1$	$1,94 \pm 0,09$	$17,8 \pm 1,0$	$2,02 \pm 0,10$
Heptámeros (Frac. 6-11)	$14,0 \pm 1,2$	$2,63 \pm 0,10$		
Acúmulos (Frac. 1-6)	$14,4 \pm 0,8$	$3,19 \pm 0,15$	$15,8 \pm 1,0$	$2,84 \pm 0,10$
Total de polisomas (Frac. 1-38)	$89,9 \pm 1,6$	$1,8 \pm 0,09$	$88,4 \pm 1,4$	$1,50 \pm 0,06$

Para comparar más fácilmente estos resultados con los obtenidos al lisar con Tritón X-100, y con los aislamientos a partir de células ERGAN, vamos a considerar unidos monosomas y dímeros en la tabla 30, ya que en aquellos no es posible calcularlos por separado.

TABLA - 30 - Polisomas de células CAE "in vitro"				
Bandas	Polisomas totales		Polisomas libres	
	% u.o.	% Act	% u.o.	% Act
Monosomas y dímeros (31-43)	$31,5 \pm 0,9$	$12,9 \pm 1,2$	$33,7 \pm 0,8$	$16,9 \pm 1,1$
Polisomas (1-31)	$68,5 \pm 1,1$	$87,1 \pm 1,8$	$66,3 \pm 1,3$	$83,1 \pm 1,9$

Hay una coincidencia casi total entre la distribución polisómica del aislamiento anterior con lisis en 0,5 % de Tritón X-100, y la de éste por homogeneización en BH-1, como se ve al comparar las tablas 28, 29 y 30.

El valor absoluto de ribosomas no ligados a membranas encontrado en estas células CAE, es igual al del total ribosómico (tabla 31); es decir, en las células CAE mantenidas "in vitro", todos los ribosomas se encuentran libres en el citoplasma.

TABLA - 31 - Contenido ribosómico de células CAE "in vitro" (u.o./ 10^8 células)	
Total ribosómico	Ribosomas libres
$10,6 \pm 0,3$	$11,5 \pm 0,4$

VI.1.4.- Análisis e interpretación de los resultados

Los datos obtenidos de la experimentación, comentados en los tres apartados anteriores, demuestran, en conjunto, la validez y adecuación de las técnicas utilizadas para aislar del citoplasma celular las estructuras ribosómicas con la mínima alteración.

También la coincidencia de los datos obtenidos a través de procesos diferentes (lisis y homogeneización) da una base sólida a la interpretación de los mismos, que, por otra parte, es coherente en sí misma.

Ello nos permite tomar valores medios representativos para cada línea celular y procesarlos paralelamente

En la tabla 32 se reúnen estos resultados, ordenados según estructuras poliribosómicas para cada línea celular; se han tomado dos parámetros de cada estructura: su cantidad relativa, frente al total aislado, y su actividad específica referida también al total.

En las células ERGAN fue muy difícil en todos los casos diferenciar entre monómeros y dímeros, por lo que se toma el valor de las dos estructuras conjuntamente.

Los hexámeros y heptámeros se consideran también juntos en una sola pareja de valores en las tres líneas.

Las diferencias observables entre células CAE y CAEL son muy pequeñas; las CAEL son algo más ricas en dímeros que, además, presentan menor actividad que las de CAE, y sus tetrámeros y pentámeros son ligeramente más activos.

Las células ERGAN son más ricas en monosomas y dímeros que las dos líneas cancerosas, ya que su porcentaje es mayor y su actividad específica es mucho menor. Presentan una cantidad de trímeros ligeramente menor, aunque de mayor actividad que las otras dos líneas.

TABLA - 32 - Conjunto ribosómico de las tres líneas estudiadas						
Línea celular	ERGAN		CAEL "in vitro"		CAE "in vitro"	
	% D. O.	% A.	% D. O.	% A.	% D. O.	% A.
Monómeros	47'3 ± 3'0	8'0 ± 2'8	9'8 ± 0'6	7'7 ± 0'2	10'9 ± 0'7	8'6 ± 1'2
Dímeros			28'9 ± 2'2	5'1 ± 0'5	21'3 ± 0'8	8'1 ± 0'9
Trímeros	7'4 ± 1'7	15'8 ± 0'6	10'9 ± 0'8	10'5 ± 0'2	11'8 ± 0'2	8'9 ± 0'2
Tetrámeros	8'9 ± 1'8	17'4 ± 0'6	10'2 ± 0'1	14'1 ± 0'9	9'7 ± 1'2	11'7 ± 0'2
Pentámeros	9'8 ± 0'6	17'7 ± 0'2	10'6 ± 0'5	16'6 ± 1'4	9'9 ± 0'5	12'4 ± 1'5
Hexámeros y Heptámeros	15'9 ± 1'9	16'6 ± 0'2	11'9 ± 1'9	17'1 ± 1'6	14'0 ± 1'3	17'7 ± 1'9
Elevado peso molecular	10'8 ± 0'1	25'0 ± 2'9	12'8 ± 1'2	20'7 ± 2'0	14'9 ± 0'9	25'7 ± 1'9

El resto de las estructuras se mantienen en proporciones semejantes en las tres líneas, excepto los polirribosomas de alto peso molecular, que están un poco por debajo en ERGAN. Sin embargo, la actividad mostrada por los polisomas de peso medio (es decir de 3 y 4 unidades) de células ERGAN es mayor que la hallada en células cancerosas. Los pentámeros se presentan tan activos como los de CAEL, y en el resto no hay variaciones.

Es decir, la distribución de la población ribosómica en polisomas de diferente número de unidades es muy similar en las tres líneas celulares, siendo las cancerosas más ricas que las normales en polisomas de 8 ó más unidades.

Las células normales frente a las cancerosas manifiestan una mayor actividad de los polisomas medios. Por otra parte, todos los polisomas de las células normales son igualmente activos, es decir, la actividad específica aparece uniformemente repartida con un máximo sobre los grandes acúmulos, y otro de menor importancia sobre los polisomas de 4 y 5 unidades. A diferencia de esto, en las células cancerosas los polisomas ganan actividad específica con el número de unidades.

Con respecto al conjunto de la población ribosómica también se observan diferencias. Así, de cada 100 millones de células de partida se obtienen:

- a) En células ERGAN $3,7 \pm 0,2$ u.o.
- b) En CAEL $7,5 \pm 0,2$ u.o.
- c) En CAE $10,5 \pm 0,3$ u.o.

De lo que se desprende que las células del tumor ascítico no hemorrágico poseen una población ribosómica dos veces mayor que las células normales de ratón, y las del tumor hemorrágico, la poseen tres veces más numerosa.

Estas son las únicas alteraciones observadas, ya que en las células as
cíticas, los ribosomas se mantienen no ligados a membranas del retículo
lo, como ocurre en las de ratón.

VI.2.- CELULAS CANCEROSAS "IN VIVO" e "IN VITRO"

Una vez estudiados algunos de los aspectos morfológicos y funcionales de los polirribosomas aislados a partir de células cancerosas mantenidas "in vivo", vamos a investigar qué influencia ejerce sobre el biopolímero la adaptación celular al medio de cultivo.

Para ello haremos un estudio paralelo al mostrado anteriormente, partiendo de células cancerosas mantenidas "in vivo", y tomaremos como control lo ya analizado en las células cancerosas de la misma cepa establecidas "in vitro".

VI.2.1.- Polisomas totales y libres de células CAEL "in vivo"

Se partió de tumor al noveno día de inoculado. Las células, extraídas con el líquido ascítico, fueron lavadas con SSS-I, suplementada con vitaminas y precalentada a 37°C. A continuación se procedió a marcar los polipéptidos nacientes con hidrolizado proteico $[^{14}\text{C}]$, empleando $3\mu\text{Ci/ml}$, en una densidad de población de 100×10^6 células/ml, durante 3 minutos, deteniéndose la incorporación por adición de 20 ml de BH-1 granizado.

También en este caso se hipotonizaron las células durante 10 minutos, lisándose a continuación en homogeneizador vidrio-teflon durante 1,5 a 2,0 minutos en el punto 3 del motor. El sobrenadante de $10.000 \times g$ se dividió en dos partes iguales, y se continuó como se ha descrito para las células "in vitro".

En el gradiente discontinuo del sobrenadante no tratado con detergente, se encontraron bandas del mismo aspecto que en los casos anteriores: ERGAN, CAEL y CAE "in vitro".

El gradiente lineal dio los resultados que se muestran en las figuras 35 y 36. En la primera, se ha representado el perfil de sedimentación de la totalidad de los polirribosomas presentes en el citoplasma, en la segunda, de sólo los libres. En ambas, entre las fracciones 2 y 44 se distinguen claramente diferenciadas 6 bandas y un pequeño pico más apreciable en la segunda, correspondientes a otros polisomas de diferentes coeficientes de sedimentación, que presentan un elevado marcado isotópico, lo que indica gran actividad de síntesis proteica.

En la zona correspondiente a dímeros y monosomas se observa el mismo efecto visto en estas células cultivadas "in vitro": el máximo de la fracción 40, en ambos gradientes, está formado por dímeros incompletos mezclados con monosomas; éstos se separan un poco en el gradiente de los polisomas no ligados a membranas (figura 36, fracción 43 y 44), y mucho menos en el de los polisomas tratados con Tritón X-100 (figura 35, fracción 43).

Los dímeros aparecen en la fracción 31 ó 32, y el resto hacia la izquierda son trímeros (fracción 25), tetrámeros (fracción 19), pentámeros (fracción 15) y de 6,7 y más unidades el resto.

En la tabla 33, se han registrado los valores relativos de cada banda frente al total expresados en porcentajes de D.O., así como sus actividades específicas en $10^3 \times \text{cpm/u.o.}$. Los monosomas se han tomado junto con los dímeros incompletos, ya que se solapan sus zonas y no se pueden diferenciar.

En la tabla 34, se comparan los valores relativos de D.O. perteneciente a ribosomas respecto del número de células de partida. En ellos, vemos que también en las células CAEL "in vivo" la totalidad de los poli

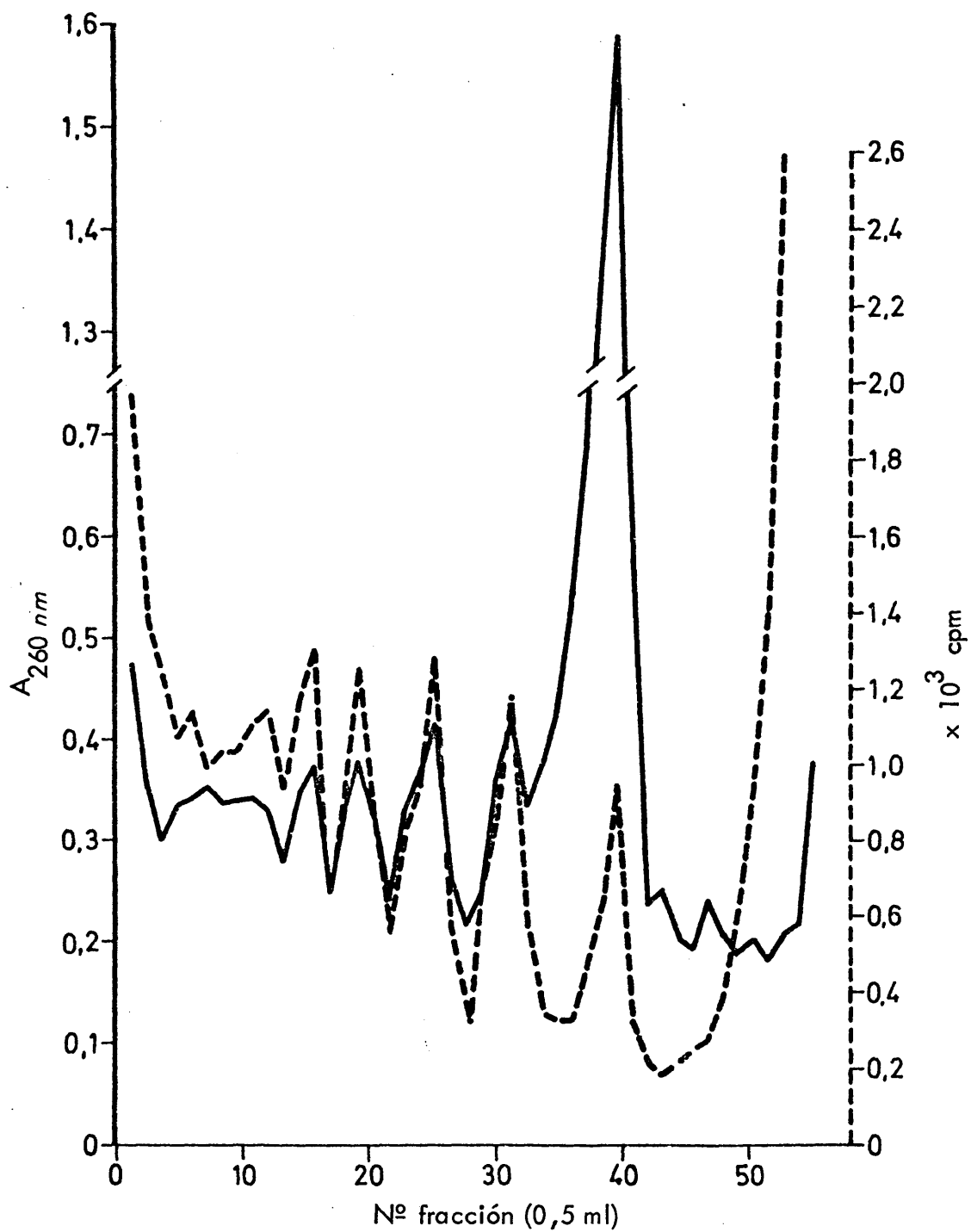


FIGURA 35.- Polisomas citoplásmicos totales de células CAEL "in vivo". Se aplica la misma técnica que se ha descrito en el caso de las células CAEL "in vitro" (Figura 30).

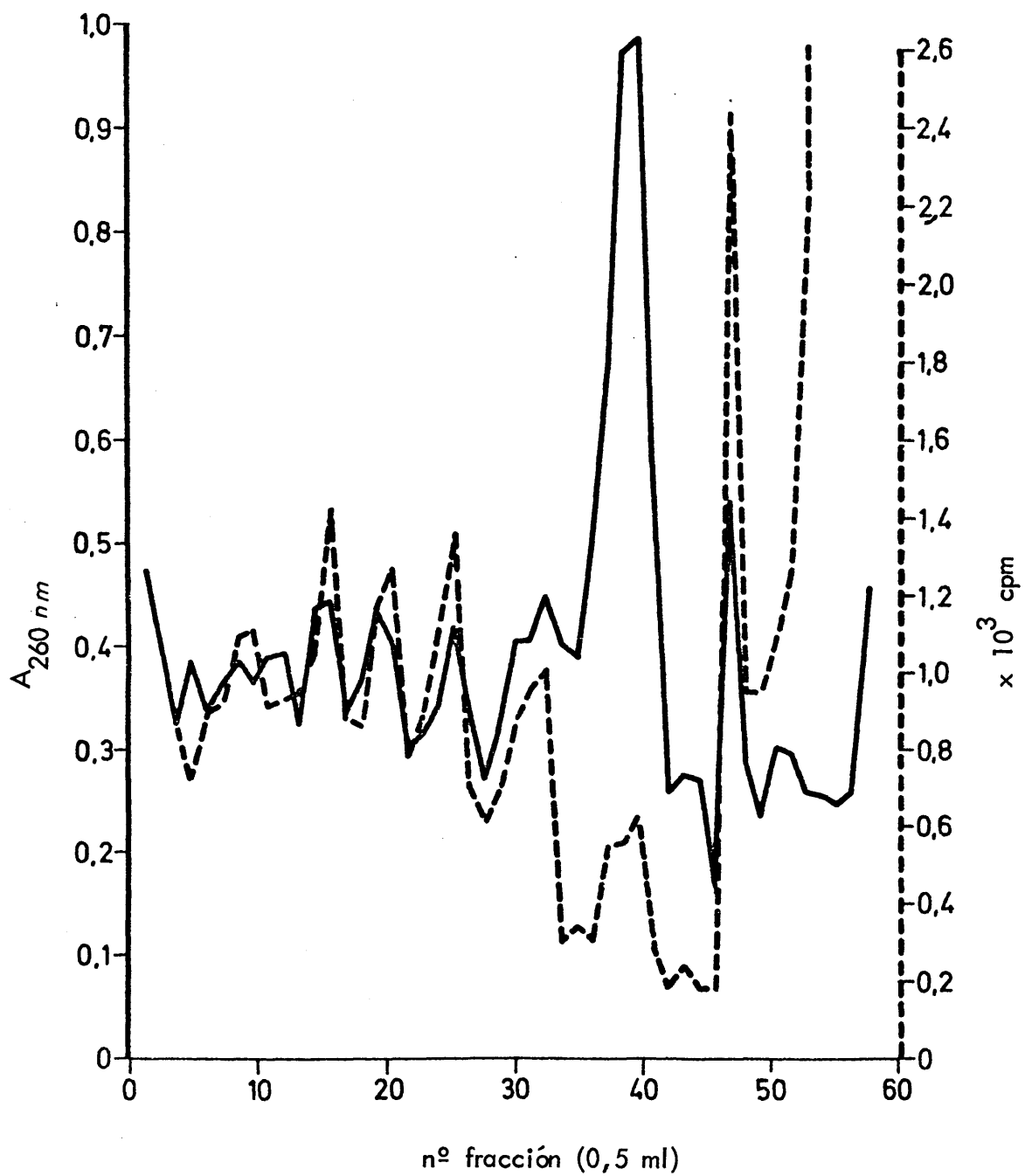


FIGURA 36.- Polisomas libres de células CAEL "in vivo". Técnica de aislamiento como la aplicada en el caso de la Figura 31.

somas se encuentran no unidos al retículo endoplásmico.

TABLA -33 - Polisomas totales y libres de células CAEL "in vivo"				
Análisis del gradiente lineal de sacarosa				
Bandas	Polisomas totales		Polisomas libres	
	%	10^3 cpm/u.o.	%	10^3 cpm/u.o.
Monosomas (Frac. 32-44)	$40,7 \pm 2,5$	$0,7 \pm 0,06$	$30,0 \pm 2,7$	$0,7 \pm 0,07$
Dímeros (Frac. 28-32)	$9,6 \pm 1,6$	$2,2 \pm 0,04$	$15,0 \pm 1,5$	$1,9 \pm 0,05$
Trímeros (Frac. 22-28)	$11,1 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,02$	$12,3 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,02$
Tetrámeros (Frac. 17-22)	$7,7 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,02$	$9,1 \pm 0,7$	$2,6 \pm 0,03$
Pentámeros (Frac. 13-17)	$7,6 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,01$	$9,1 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,02$
6 y más unidades (Frac. 3-17)	$23,1 \pm 1,5$	$3,4 \pm 0,09$	$24,5 \pm 1,6$	$2,6 \pm 0,10$
Total polisómico (Frac. 3-32)	$59,3 \pm 1,3$	$2,9 \pm 0,05$	$70,0 \pm 1,4$	$2,5 \pm 0,06$

TABLA - 34 - Contenido ribosómico de células CAEL "in vivo" (u.o./ 10^8 células)	
Total ribosómico	Ribosomas libres
$2,68 \pm 0,4$	$2,70 \pm 0,2$

VI.2.2.- Polisomas de CAEL "in vitro". Comparación con los resultados anteriores e interpretación.

El perfil de sedimentación de las células CAEL "in vitro" ha sido ya descrito y comentado en el apartado VI.1.2 de esta Memoria.

Aquí vamos a tomar los valores medios representativos de ambas situaciones (cultivo "in vivo" e "in vitro"), estudiar sus diferencias, si las hubiere, e intentar explicarlas.

De la tabla 35 se desprende que las CAEL "in vivo" poseen una abundante cantidad de monómeros, siendo muy pocos los producidos por degradación de polisomas de alto peso molecular ya que la actividad específica presentada por ellos es sólo el 4 % del total. Observando las fracciones de monosomas al microscopio electrónico, se ve que éstos están mezclados con dímeros incompletos.

El paso de mantenimiento "in vivo" a "in vitro" supone en los ribosomas de estas células ascíticas una gran disminución del número de monosomas; que pasan del 35 al 10 %; aumento de dímeros, del 12 al 28 %; los de 3, 4 y 5 unidades permanecen constantes, así como su actividad de síntesis; los polisomas de 6, 7 y más unidades aparecen en bandas excesivamente juntas para dar datos claramente discernibles, por ello, los consideramos en conjunto, así vemos que prácticamente hay la misma cantidad en ambas líneas celulares y que su actividad es muy parecida. Tomando este último grupo, banda a banda, aún con el error que supone, obtenemos que la cantidad de polisomas de alto peso molecular (8 unidades y más) de las "in vivo" es muy inferior al de las "in vitro".

En cuanto a la población total registrada en ambos sistemas es, por cada 100 millones de células de partida, de:

- a) CAEL "in vivo" $3,1 \pm 0,3$ u.o.
- b) CAEL "in vitro" $7,5 \pm 0,2$ u.o.

Es decir, al establecer "in vitro" la línea, se duplica la población ribosómica total.

TABLA - 35 - Conjunto ribosómico de las dos líneas estudiadas				
Línea celular	CAEL "in vivo"		CAEL "in vitro"	
	% u.o.	% Actividad específica	% u.o.	% Actividad específica
Monómeros	35,4 ± 3,0	3,7 ± 0,2	9,8 ± 0,6	7,7 ± 0,2
Dímeros	12,3 ± 1,9	11,2 ± 0,2	28,9 ± 2,2	5,1 ± 0,5
Trímeros	11,7 ± 0,6	13,9 ± 0,1	10,9 ± 0,8	10,5 ± 0,2
Tetrámeros	8,4 ± 0,7	14,4 ± 0,1	10,2 ± 0,1	14,1 ± 0,9
Pentámeros	8,4 ± 0,7	16,6 ± 0,3	10,6 ± 0,5	16,6 ± 1,4
Hexámeros y Heptámeros	16,7 ± 1,7	16,0 ± 0,4	11,9 ± 1,9	17,1 ± 1,6
Elevado peso molecular	7,1 ± 1,5	18,7 ± 0,9	12,8 ± 1,2	20,7 ± 2,0

Por otra parte, comparando las células ascíticas "in vivo" con las ER-GAN^m, vemos que la distribución polisómica es muy parecida en ambos

casos (ver tabla 32), incluso sus dotaciones ribosómicas totales son muy aproximadas.

VI.2.3.- Polisomas de CAE "in vivo" e "in vitro"

Se observó el mismo fenómeno que en las CAEL. Es decir, una gran abundancia de monosomas y dímeros en las "in vivo", menor cantidad de los polisomas de 8 ó más unidades que en las "in vitro", y una también menor densidad de población ribosómica.

Ambas cepas tumorales "in vivo" son extremadamente parecidas entre sí. Esto mismo se observó en las establecidas "in vitro".

VI.3.- FASE S del CICLO CELULAR.

Una vez estudiadas las distribuciones polisómicas y su actividad en poblaciones celulares cancerosas, conociendo cómo influye sobre ambos aspectos moleculares, tanto la malignización como el establecimiento en cultivos en suspensión, podemos analizar el comportamiento polisómico en estas células tumorales en particular.

Quizá sea la fase S o de síntesis de DNA, la que proporcione unos resultados más claros y con más probabilidades de ser correctamente interpretados, ya que, en esa fase, se sintetizan muy pocas proteínas.

Como ya expusimos en la Introducción, todas las técnicas de sincronización en esa fase alteran de alguna manera el metabolismo celular. Es posible que la de doble choque con TdR, usada aquí, sea la más próxima al sistema utilizado normalmente por la célula para regular la síntesis de DNA (46). Por otra parte, no se han encontrado efectos secundarios de la TdR (36).

VI.3.1.- Polirribosomas durante la fase S del ciclo celular en células CAEL

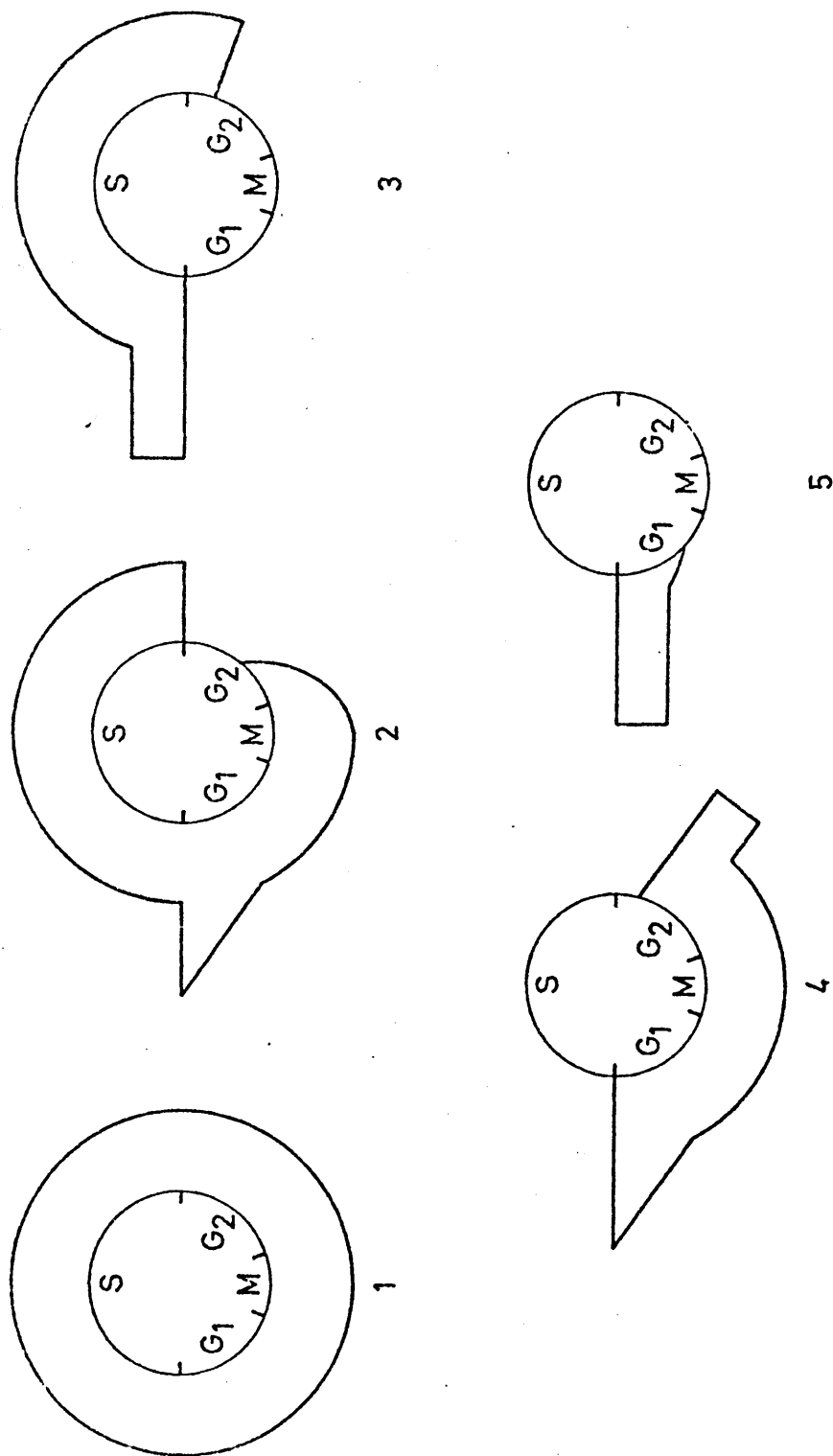
Se tomaron 30 tubos con 25 ml de suspensión celular en fase logarítmica de crecimiento, y se sincronizaron por medio de dos tratamientos con exceso de timidina de 17 horas de duración, separados por un periodo de activación de 8 horas (ver Materiales y Métodos). De esta forma las células quedan detenidas en su evolución a través del ciclo celular, al final de la fase G_1 previa a la síntesis de DNA, ya que la timidina - inhibe esta última. Gráficamente el fenómeno se podría presentar como en el esquema 7.

A continuación se incubó el cultivo 2 horas con AdR, GdR y CdR, en cantidades fisiológicas para favorecer la reanudación del ciclo, y que - ésta se produzca de forma homogénea por parte de todas las células de la población. Para comprobarlo, una alícuota fue marcada con TdR [3H]. La autorradiografía de la preparación dió como resultado un 80 % de células marcadas, es decir, en fase de síntesis de DNA, coincidiendo con las pruebas previas realizadas a tal efecto (ver Materiales y Métodos). Así se obtuvo un cultivo sincronizado en fase S temprana.

La misma técnica empleada para diferenciar polirribosomas libres del resto polisómico celular aplicada anteriormente a células normales y tumorales, nos da en el caso de las células CAEL sincronizadas en fase S, los resultados representados en las figuras 37 y 38.

En la figura 37 se muestra el perfil de sedimentación del total polisómico celular.

En la zona de las fracciones 32 a 42, se pueden distinguir tres picos nítidamente diferenciados que, observados al microscopio electrónico, son: monómeros (máximo en 40), asociación de ribosoma-subunidad 60 S (máxi-



ESQUEMA 7.- Sincronización por doble choque de TdR (500 g/ml)

1.- Población multifásica. 2.- Primer choque con exceso de TdR; las células en fase S se detienen, las demás progresan hasta S. 3.- Se elimina la TdR y las células progresan. 4.- Segundo choque con TdR. 5.- La población celular completa llega al comienzo de S. (138).

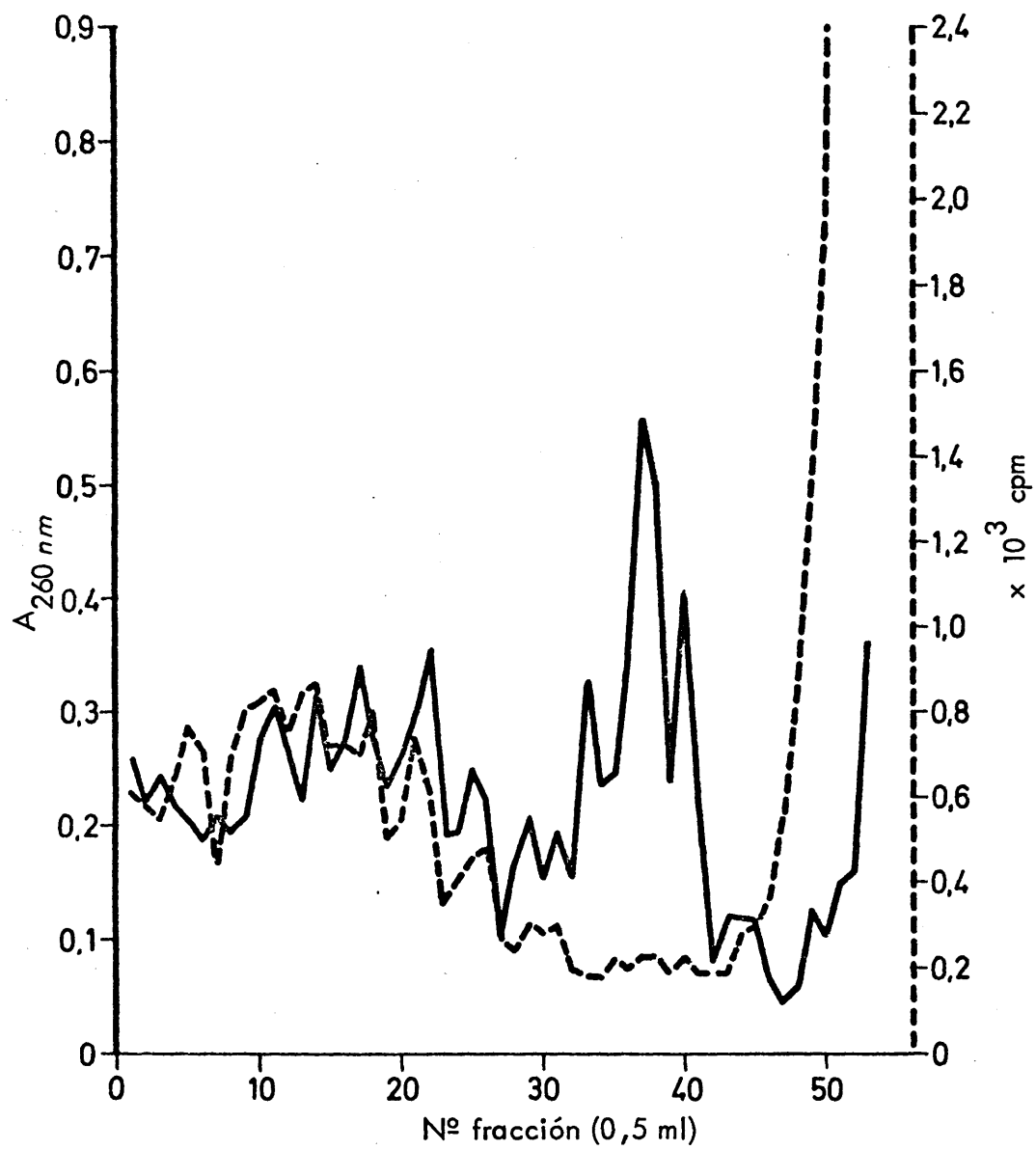


FIGURA 37.- Polisomas totales. Células CAEL en fase de síntesis de DNA. El aislamiento de polisomas se hace como el de la Figura 30.

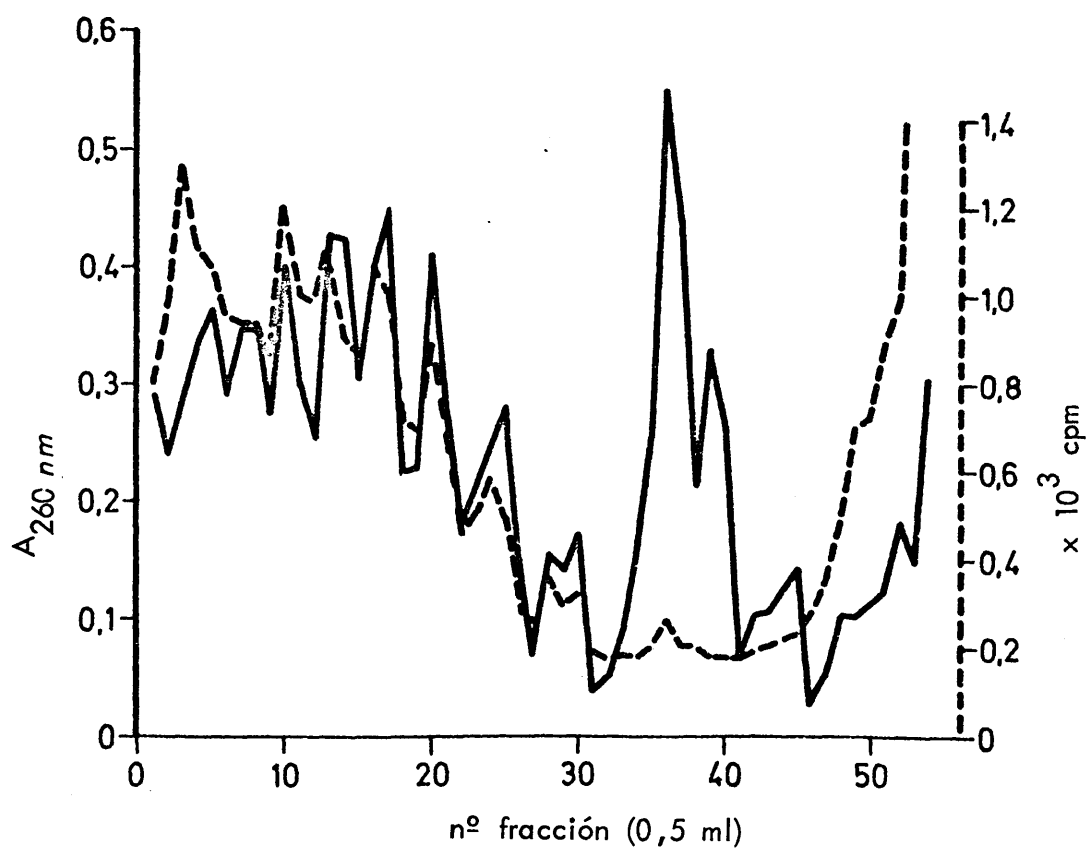


FIGURA 38.- Polisomas libres. Células CAEL sincronizadas en fase de síntesis de DNA. Técnica de aislamiento descrita anteriormente para la Figura 31.

mo en 37), lo que hemos llamado anteriormente "dímeros incompletos"* y el tercero dímeros (máximo en 33). A la izquierda aparecen los trímeros, tetrámeros, etc.

En el gradiente de los no ligados a membrana (figura 38) la separación entre monosomas y "dímeros incompletos" es buena, pero éstos últimos se solapan con la zona de los dímeros.

El resto de las zonas se presentan bien diferenciadas en ambos gradientes, obteniéndose además mayor número de bandas que en los casos de poblaciones celulares en multifase. Se pueden distinguir perfectamente los polisomas de 6 unidades (frac. 15 a 18), los de 7 (frac. 12 a 15), incluso los de 8 se despegan del resto de los polisomas de alto peso.

La actividad de síntesis es notable, presentándose el máximo en los polisomas de más alto coeficiente de sedimentación (fracciones 2 a 6) en la figura 38.

Las cantidades relativas de cada banda respecto al total, así como las actividades específicas de las mismas, se resumen en la tabla 36.

La distribución de los ribosomas en estructuras de diferentes pesos moleculares es muy parecida en ambos casos; en el total ribosómico, aparecen más dímeros y menos polisomas de gran tamaño que entre los libres.

Tomando la D.O. total registrada entre las fracciones 2 a 40, y refiriéndola al número de células de partida, obtenemos, como hemos hecho en todos los experimentos anteriores, los ribosomas y polirribosomas contenidos en los citoplasmas. Comparando los valores hallados para los polisomas libres, con los del total, vemos la relación cuantitativa que los une.

*La constante aparición de estos "dímeros incompletos" en los aislamientos realizados a partir de células CAEL y CAE, y sólo en ellos, hace descartar la posibilidad de que sean un artefacto producido por la técnica.

TABLA - 36 - Polisomas totales y libres de células CAEL sincronizadas en fase S				
Análisis del gradiente lineal de sacarosa				
Bandas	Polisomas totales		Polisomas libres	
	%	10^3 cpm/u.o.	%	10^3 cpm/u.o.
Monosomas (Frac. 39-42)	$8,9 \pm 0,9$	$0,6 \pm 0,1$	$7,3 \pm 1,0$	$0,5 \pm 0,2$
Dímeros * (Frac. 32-39)	$22,1 \pm 0,2$ **	$0,7 \pm 0,2$	$14,4 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,4$
Trímeros (Frac. 27-32)	$9,2 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,3$
Tetrámeros (Frac. 23-27)	$10,8 \pm 1,1$	$2,7 \pm 0,7$	$9,1 \pm 0,9$	$2,3 \pm 0,6$
Pentámeros (Frac. 19-23)	$9,6 \pm 0,7$	$2,9 \pm 0,7$	$10,5 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,7$
Hexámeros (Frac. 16-19)	$11,2 \pm 0,9$	$4,9 \pm 0,3$	$11,0 \pm 0,9$	$2,7 \pm 0,7$
Heptámeros (Frac. 13-16)	$10,1 \pm 0,9$	$5,4 \pm 0,3$	$11,3 \pm 0,9$	$2,9 \pm 0,4$
Octámeros (Frac. 9-13)	$9,5 \pm 1,1$	$4,9 \pm 1,2$	$9,8 \pm 1,2$	$2,9 \pm 1,2$
Alto peso molecular (Frac. 2-9)	$16,1 \pm 1,2$	$5,8 \pm 1,4$	$22,1 \pm 1,1$	$3,3 \pm 1,3$
Total de polisomas (Frac. 2-39)	$91,1 \pm 0,8$	$3,7 \pm 1,3$	$92,7 \pm 0,7$	$3,8 \pm 1,2$

* Se toman dímeros y "dímeros incompletos" juntamente, ya que en la mayor parte de los fraccionamientos no se pueden separar bien unos de otros.

** Los dímeros suelen ser el 6 % del total, y los "dímeros incompletos" el 17 %

Para estas células los valores calculados son los que figuran en la ta
bla 37.

<div> <div>TABLA -37-</div> <div>Contenido ribosómico de células CAEL sincronizadas en fase S (u.o./10⁸ cél)</div> </div>	
Total polisómico	Polisomas libres
5,5 ± 0,2	3,0 ± 0,2

Sorprendentemente hay una notable diferencia entre el número de polisomas libres y el de los totales. Es decir, las células de tumor ascítico no hemorrágico, sincronizadas en fase S temprana del ciclo celular, contienen del 55 al 60 % de sus ribosomas libres en el citoplasma, y el resto se une a membranas del retículo. Estos resultados son el valor medio de tres fraccionamientos realizados a partir de tres cultivos distintos.

VI.3.2.- Relaciones entre polisomas en tumor CAEL y en células CAEL en fase S

La simple exposición de los fenómenos observados en los fraccionamientos de polisomas de células CAEL en fase de síntesis de DNA, ya nos da idea de que las situaciones en las que se encuentran los polisomas, en uno y en otro caso, son totalmente diferentes.

Lo primero que se aprecia es que las células en fase S tienen menos ribosomas que cuando se toma el conjunto celular multifásico:

Tumor CAEL "in vitro"	7,2 ± 0,2 u.o./10 ⁸ células
Células CAEL en fase S	5,5 ± 0,2 " "

Puede ser debido a que el proceso de sincronización es tóxico para las células, ya que precisamente inhibe la síntesis de DNA y se destruyen los ribosomas, o bien, a que, como en esa fase la célula apenas realiza otra función bioquímica que no sea la síntesis de DNA, precisa menor cantidad de ribosomas y entonces estos resultados serían reflejo veraz de la realidad.

En la tabla 38 se muestran juntamente las características de ambas situaciones.

El perfil de sedimentación de ribosomas de ambos casos es muy parecido. Los valores alcanzados por la D.O. dan cantidades muy próximas para monómeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros. Las CAEL multifásicas son más ricas en dímeros que las en fase S; este dato está sujeto a más error que los otros, debido a la presencia de las partículas ribosoma-subunidad 60 S que se solapan con los dímeros. En las células sincronizadas se pudo ver que aproximadamente el 30 % de la banda dímeros-"dímeros incompletos" corresponde a dímeros sólo (que es el 6 % del total ribosómico). En cuanto a polisomas de 6 unidades en adelante, las células en fase S son mucho más ricas que las multifásicas.

La actividad de síntesis de proteínas de cada estructura manifiesta también un interesante cambio de las CAEL en fase S frente a las multifásicas: los polirribosomas de 2 a 5 unidades de las células en fase de síntesis de DNA, son mucho menos activos que sus homólogos en las -- otras células; sin embargo, los polirribosomas de 6, 7 y más unidades -- son mucho más activos en las CAEL en S que en las no sincronizadas.

TABLA -38- Conjunto ribosómico de las dos situaciones celulares				
Células	CAEL multifásicas (Total ribosómico)		CAEL en fase S (Total ribosómico)	
Bandas	Cantidad relativa % u.o.	Actividad relativa %cpm/u.o.	Cantidad relativa % u.o.	Actividad relativa %cpm/u.o.
Monómeros	$9,8 \pm 0,6$	$7,7 \pm 0,2$	$8,9 \pm 0,9$	$2,0 \pm 0,2$
Dímeros *	$28,9 \pm 2,2$	$5,1 \pm 0,5$	$22,1 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,4$
Trímeros	$10,9 \pm 0,8$	$10,5 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,9$	$5,4 \pm 0,2$
Tetrámeros	$10,2 \pm 0,1$	$14,1 \pm 0,9$	$10,8 \pm 1,1$	$9,2 \pm 1,0$
Pentámeros	$10,6 \pm 0,5$	$16,6 \pm 1,4$	$9,6 \pm 0,7$	$9,8 \pm 1,3$
Hexámeros	$11,9 \pm 1,9$	$17,1 \pm 1,6$	$11,2 \pm 0,9$	$16,6 \pm 1,4$
Heptámeros			$10,1 \pm 0,9$	$18,3 \pm 1,5$
Octámeros	$12,8 \pm 1,2$	$20,7 \pm 2,0$	$9,5 \pm 1,1$	$16,6 \pm 1,9$
Alto peso molecular			$16,1 \pm 1,2$	$19,7 \pm 2,0$

* Se han considerado dímeros y "dímeros incompletos" juntamente.

VII.- CONCLUSIONES

Vamos a resumir a continuación las conclusiones a las que nos llevan los resultados ya vistos clasificándolas en dos grupos según el orden seguido en el estudio:

- 1) Respecto a las condiciones experimentadas y su influencia sobre los perfiles polisómicos.
- 2) Respecto a los perfiles polisómicos de cada especie estudiada, en el aspecto de conjunto celular y de célula en particular.

VII.1.- INFLUENCIA de las CONDICIONES del AISLAMIENTO

- 1) El rendimiento de homogeneización en buffer isotónico es demasiado bajo para células CAE y CAEL de membrana celular resistente.
- 2) En buffer hipotónico, las fuerzas de cizalla (a partir de un cierto valor) degradan los polisomas de peso molecular alto a otros menores.
- 3) El choque hipotónico, seguido de homogeneización manual, da resultados no reproducibles en cuanto a rendimiento y distribución polisómicas.
- 4) Las células de tumores ascíticos hemorrágicos pueden separarse de las células rojas por centrifugación a bajas velocidades, en menos de 30 minutos y a 0° C, de forma que no se degradan los polisomas, pero se pierden células cancerosas posiblemente de forma selectiva según sus densidades.
- 5) Homogeneizando (mecánica y suavemente) en buffer hipotónico y purificando el crudo por centrifugación fraccionada de 700 y 10.000 x g se consigue, tanto en células ERGAN como en CAE:
 - a) Separar los núcleos sin que se rompan

- b) Retirar totalmente las mitocondrias.
 - c) En la pella nuclear quedan el 30 % o más de los ribosomas totales de la célula; en ellos abundan los polisomas de 7 unidades principalmente, que representan el 17 % del total polisómico celular.
 - d) En la pella mitocondrial aparecen el 29 % de los ribosomas contenidos en el sobrenadante postnuclear, siendo los más abundantes los polisomas de 4 unidades, que representan el 17 % del total postnuclear. Es decir, según lo anterior, al gradiente final de sacarosa llega aproximadamente el 50 % de la población total ribosómica del citoplasma celular, con una pequeña pérdida selectiva de polisomas de 7 ó más unidades.
- 6) De acuerdo con lo hallado por otros investigadores en diferentes sistemas celulares, también en nuestras líneas celulares, el aumento de la fuerza iónica del medio de aislamiento favorece la recuperación de polisomas en cualquier concentración de detergente. Las condiciones óptimas halladas por nosotros para no alterar en lo posible la estructura polisómica nativa, son las que corresponden a un buffer Tris-HCl 0,02 M pH 7,5; 0,15 M en KCl ; 0,005 M en $MgAc_2$ y 0,5 % de Tritón X-100.

De todas formas, estas condiciones de lisis no impiden que el 30 % de los ribosomas sean arrastrados por los núcleos en su centrifugación; por otra parte, una intensificación de las mismas (Triton X-100 al 0,5% seguido de 3 golpes de pistón de teflon) conduce a una gran pérdida de actividad específica de los polisomas y puede enmascarar la proporción real de polisomas ligados a membranas (muy baja, si es que existe alguno, como se ve posteriormente) de estas células. Por ello se decidió usar la homogeneización suave en medio hipotónico, aumentando la cantidad del material de partida.

- 7) Los polisomas purificados y libres de detergente no se pudieron mantener a -20°C , ya que ello condujo a formaciones de agregados inespecíficos, así como a degeneraciones estructurales con aumento de subunidades, por lo que siempre se usó material fresco.

VII.2.- ACTIVIDAD POLISOMICA. CONJUNTO CELULAR y CELULAS en FASE S.

VII.2.1.- Células normales y cancerosas. Crecimiento logarítmico y fase S.

- 1) La distribución polisómica de las dos líneas de tumor ascítico "in vitro" es muy parecida a la de las células normales ERGAN.

En cuanto a la actividad de síntesis proteica es del mismo orden en ambos tipos celulares; las células normales la tienen repartida homogéneamente entre todas las estructuras polisómicas, en tanto que las cancerosas presentan un aumento de actividad con el peso molecular de la estructura. Es decir, las células de los dos tumores ascíticos sintetizan sobre todo - proteínas de alto peso molecular.

- 2) La cantidad total de polisomas registrada es menor en células normales, intermedia en las de tumor no hemorrágico, y mayor en las de tumor - hemorrágico, en perfecto acuerdo con una síntesis de proteínas específicamente tumorales sobre las normales.

La diferencia entre tumor no hemorrágico (CAEL) y el hemorrágico (CAE), puede entonces residir en un aporte proteico por parte de las células del tumor hemorrágico, que no se produce en las del no hemorrágico.

- 3) En ninguno de los tres tipos celulares, se detectan polisomas unidos a membranas. En cuanto a las células de embrión de ratón, este resultado coincide con los descritos en la bibliografía; respecto a las de -

tumor ascítico de Ehrlich hay disparidad de opiniones.

Nosotros hemos encontrado en éstas últimas que el 40 % de los polisomas totales están unidos a membranas cuando las células se recogen en fase temprana de síntesis de DNA.

El tiempo del ciclo celular (T_c) de las CAEL "in vitro" es de 25 horas aproximadamente (figura 6), de las que 7 corresponden a la fase S. Es decir, que en una población de 100 millones de células en crecimiento logarítmico, 28 de éstos se encuentran en fase de síntesis de DNA. Si suponemos que la mitad de éstos a su vez están en fase S temprana, tenemos un 14 % de la población conteniendo el 40 % de sus polisomas ligados a membranas. Esto supone que, aproximadamente el 6 % del total polisómico aislado a partir de células en crecimiento logarítmico, permanece unido a membranas. El 6 % expresado en unidades de recuperación es $0,33 \text{ u.o.}/10^8$ células; este valor queda dentro del error de recuperación de la técnica, por lo que en una población multifásica pasa desapercibido.

Esto parece indicar que la presencia o ausencia de polisomas unidos a membranas es, en células CAEL "in vitro", un fenómeno totalmente funcional, es decir, se produce o no, según las necesidades específicas de la célula en cada momento. En las condiciones de cultivo en suspensión en medio B suplementado con 20 % de suero de ternera, no se detectan durante la fase de crecimiento logarítmico (es decir, población en todas las fases del ciclo celular), y se encuentran en un 40 % durante la fase S. Puede ser lógico pensar que sucede así realmente, ya que las histonas y demás proteínas principalmente sintetizadas en ese momento por la célula, deben ser transportadas al interior del núcleo, y además los polisomas de 6 y 7 unidades son más activos en células en fase S que en multifase, siéndolo menos los de 2 a 5.

Por otra parte, no se puede descartar la posibilidad de que sea una consecuencia del proceso de sincronización, mientras no se obtenga el mis-

mo resultado sincronizando en S por otro camino.

VII.2.2.- Células cancerosas "in vivo" e "in vitro"

- 1) El paso de "in vivo" a "in vitro" implica en las células CAE y CAEL una duplicación de la población ribosómica con aumento de la cantidad relativa de polisomas de alto peso molecular y disminución de la de monosomas.
- 2) Esto unido al llamativo incremento* de hidrolizado proteico [^{14}C], necesario para obtener un marcado de polisomas de las células "in vitro", indica que al establecerse en un medio mucho más rico en aminoácidos que el suero ascítico del que procedían, se acelera extraordinariamente el metabolismo; también se refleja este hecho en el aumento de la velocidad de crecimiento de la población, por lo que el ciclo celular en el interior del tumor es más largo que "in vitro"
- 2) El resto de la población polirribosómica también se ve alterada. "In vivo" los polisomas más numerosos son los de 6 a 7 unidades, seguidos de los dímeros y trímeros. Estos últimos son más numerosos que "in vitro" y más activos. Es decir, las células CAEL "in vivo" sintetizan proteínas de tamaño intermedio que no necesitan al adaptarse a crecimiento "in vitro"
- 3) La estructura hallada en estos experimentos y denominada "dímeros incompletos" se mantiene durante el proceso de adaptación a crecimiento en medio B, ya que se observa tanto "in vivo" como "in vitro". No se puede aventurar ninguna interpretación acerca de su función, ya que no se ha experimentado nada en tal sentido.

*El aumento es de 20 veces respecto a la cantidad utilizada "in vivo"

BIBLIOGRAFIA

- (1) ABRAHAM, K.A. PRYME, I.F. ÅBRO, A. y DOWBEN, R.M.:
Exptl. Cell Res. 82: 95 (1973)
- (2) ADELMAN, M.R., SABATINI, D.D. y BLOBEL, G.: J. Cell
Biol. 56: 206 (1973)
- (3) ARLINGHAUS, R.B. y ASCIONE, R.: Methods in Mol. Biol.
(Ed. A.I. Laskin y J.A. Last) Vol. 2 (1972) p.33.
- (4) ANDREWS, T.M. y TATA, J.R.: Biochem. J. 121: 683 (1971)
- (5) ASCIONE, R., ARLINGHAUS, R.B. y De WOUNDE, G.F. van:
Methods in Mol. Biol. (Ed. A.I. Laskin y J.A. Last) Vol 2 (1972)p.59.
- (6) ASCONAS, B.A. y WILLIAMSON, A.R.: Biochem. J. 109: 637 (1968)
- (7) BALDUZZI, P y MORGAN, H.R.: J. Virol. 5: 470 (1970)
- (8) BARRET, K.: J. Nat. Can. Inst. 37: 443 (1966)
- (9) BERENBLUM, I.: Cancer Res. 2: 129 (1954)
- (10) BERENBLUM, I.: Cancer Res. 14: 471 (1954)
- (11) BERENBLUM, I. y SHUBIK, P.: Brit. J. Cancer 1: 383 (1947)
- (12) BIAL, M.: Deut. Med. Wochschr. 29: 253 y 477 (1903)

- (13) BIRNIE, D.G.: Subcelular Components (Ed. D.G. Birnie)
A.P. (1972) p.235.
- (14) BLOEMENDAL, H., BONT, W.S. y BENEDETTI, E.L.: Biochim.
Biophys. Acta 87: 177 (1964)
- (15) BLOEMENDAL, H., BONT, W.S., VRIES, M. de, y BENEDETTI,
E.L.: Biochem. J. 103: 177 (1967)
- (16) BLOBEL, G. y POTTER, V.R.: J. Mol. Biol. 28: 539 (1967)
- (17) BONANOU-TZEDAKI, S.A., y ARNSTEIN, H.R.V.: Subcelular
Components (Ed. D.G. Birnie) A.P. (1972) p. 215.
- (18) BOOTSMA, D., BUDKE, L. y VOS, O.: Exptl. Cell Res. 33:
301 (1964)
- (19) BRESNICK, E., y KARJALA, R.: Cancer Res. 24 84 (1964)
- (20) BREW, K.: Nature 223: 671 (1969)
- (21) BREW, K. y CAMPBELL, P.N.: Biochem. J. 102: 265 (1967)
- (22) BREW, J., VANAMAN, T.C., y HILL, R.L.: Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S. 59: 491 (1968)
- (23) BRODBECK, U., DENTON, W.L., TANASHI, N. y EBNER, K.E.
J. Biol. Chem. 242: 1391 (1967)
- (24) BROWN, J.C., y SMITH, A.E.: Nature 226: 610 (1970)

- (25) BURGHOUTS, J. Th. M., STOLS, A.L.H., y BLOEMENDAL, H.:
Biochem. J. 119: 749 (1970)
- (26) BURTON, K.: Biochem. J. 62: 315 (1958)
- (27) CAMPBELL, P.N.: F E B S Letters 7: 1 (1970)
- (28) CAMPBELL, P.N., LOWE, E. y SHARP, M.D.B.: Biochem. J. 99:
22c (1966)
- (29) CAMPBELL, P.N., SERCK-HANSEN G. y LOWE, E.: Biochem.
J. 97: 422 (1965)
- (30) CARTOUZOU, G., POIRÉE, J.C., y LISSITZKY, S.: Eur. J.
Biochem. 8: 357 (1969)
- (31) CASTAÑEDA, M. y SANCHEZ, R.: Anal. Biochem, 44: 381 (1971)
- (32) CHU, E.H.Y., STANDFORD, K.K. y EARLE, W.R.: J. Nat. Can.
Inst. 21: 729 (1958)
- (33) COFFEY, R.G. y REITHEL, F.J.: Biochem. J. 109: 169 (1968)
- (34) CORNMAN, I., GARGUŞ J.L. y MacDONAL, M.: Cancer. Res.
20: 377 (1960)
- (35) CORNUDELLA, L., FAIFERMAN, I. y POGO, A.O.: Biochim.
Biophys. Acta, 294: 541 (1973)
- (36) CRAIG, N.: J. Cell Physiol. 82: 133 (1973)

- (37) DALLNER, G., BERGSTRAND, A. y NILSSON, R.: J. Cell Biol. 38: 257 (1968)
- (38) DARNELL, J.E.Jr.: Bacteriol, Rev. 32: 262 (1968)
- (39) DISCHE, T.: Mikochemie 8: 4 (1930)
- (40) ENG, C.P. y MORGAN, J.F.: Canad. J. Biochem. 47: 871 (1969)
- (41) FAIFERMAN, I., CORNUDELLA, L. y POGO, A.O.: Science 233 : 234 (1971)
- (42) FAIFERMAN, I., CORNUDELLA, L. y POGO, A.O.: Nature New Biol. 233 234 (1971)
- (43) FAIFERMAN, I., POGO, A.O., SCHWARTZ, J. y KAIGHN, M.E.: Biochim. Biophys. Acta 312 492 (1973)
- (44) FOULDS, L.: J. Chron, Dis. 8: 2 (1958)
- (45) GALAVAZI, G., SCHENK, H. y BOOTSMA, D.: Exptl. Cell. Res. 41: 428 (1966)
- (46) GALAVAZI, G. y BOOTSMA, D.: Exptl. Cell Res. 41: 438 (1966)
- (47) GAYE, P., HOUEBINE, L., PETRISSANT, G. y DENAMUR, R.: Acta Endocrinol. Suppl. 180: 426 (1973)
- (48) GIELKENS, A.L.J., BERNIS, T.J.M. y BLOEMENDAL, H.: Eur. J. Biochem. 22: 478 (1971)

- (49) GOLDSTEIN, E.S., REICHMAN, M.E. y PENMAN, S.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71 (12): 4752 (1974)
- (50) GOLDSTEIN, J.L. y SINSHEIMER, R.L.: J. Mol. Biol. 23: 495 (1967)
- (51) GONZALEZ-CADAVID, N.F. y CAMPBELL, P.N.: Biochem. J. 105: 443 (1967)
- (52) GORDON, H.L., BARDOS, T.J. CHMIELEWICZ, Z.F. y AMBRUS, J.L.: Cancer Res. 28: 2068 (1968)
- (53) GRANT, A.G. y BLACK, E.G.: Eur. J. Biochem. 47: 397 (1974)
- (54) GUERIN, M.M. y MORGAN, J.F.: Cancer Res. 21: 378 (1961)
- (55) HANKS, J.H. y WALLACE, R.E.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 71: 196 (1949)
- (56) HANSEMAN, D. von.: Die Mikroskopische Diagnose der Bösartigen Geschwülste. Berlin (1897)
- (57) HENSHAW, E.C.: J. Mol. Biol. 36: 401 (1968)
- (58) HEYWOOD, S.M.: Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34: 799 (1969)
- (59) HEYWOOD, S.M.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 67: 1782. (1970)
- (60) HICKS, S.J., DRYSDALE, J.W. y MUNRO, H.N.: Science 184: 584 (1969)

- (61) HIGASHI, T. y PETERS, T., Jr.: J. Biol. Chem. 238: 3952
(1963)
- (62) HIGASHI, K., KURAGANO, T. y HANASAKI, N.: Cancer Res.
33: 734 (1973)
- (63) HOGAN, B.L.M. y KORNER, A.: Biochim. Biophys Acta 169:
129 (1968)
- (64) HOGAN, B.L.M., y KORNER, A.: Biochim. J. 100: 74P (1966)
- (65) HOWARD, A. y PELC, S.R.: Exptl. Cell Res. 2: 178 (1951)
- (66) HOWARD, A. y PELC, S.R.: Heredity (Suppl.) 6: 261 (1953)
- (67) HSU, T.C. y ARRIGHI, F.E.: Karyological Methods. Methods in
Cancer Res. (Ed.H. Busch) A.P.N.Y. (1967) p.117.
- (68) KAEMPFER, R.: Nature 222: 950 (1969)
- (69) KASTEN, F.H., y STRASSER, F.F.: J. Cell. Biol. 27: 50A (1965)
- (70) KASTEN, F.H., STRASSER, F.F. y TURNER, M.: Nature 207: 161
(1965)
- (71) KERR, I.M.: Biochem. J. 98: 826 (1966)
- (72) KIT, S. y DUBBS, D.R.: Virology 18: 274 (1962)
- (73) KLEIN, G.: Cancer Res. 11: 466 (1951)
- (74) KLENOW, H.: Biochim. Biophys. Acta 61: 885 (1962)

- (75) KOLLER, P.C.: Brit. J. Can. 1: 38 (1947)
- (76) KASTEN, F.H. y STRASSER, F.F.: Nature 211: 135 (1966)
- (77) KURLAND, C.: Science 169: 1171 (1970)
- (78) KUWANO, M., ENDO, H. y IKEHERA, Y.: Cancer Res. 33:
2.965 (1973)
- (79) LALA, P.K.: Methods in Can. Res. Vol. VI (ED. H. Busch)
A.P.N.Y. (1971) p. 4
- (80) LAMFROM, F. y KNOPF, S.: J. Mol. Biol. 11: 589 (1965)
- (81) LEE, S.Y.: Biochemistry 10: 895 (1971)
- (82) LEVAN, A. y BIESELE, J.J.: Ann. N. Y. Acad. Sci 71:
1.022 (1958)
- (83) LEVINE, M.: J. Cancer Res. 14: 400 (1930)
- (84) LEVINE, E.M., JENG, D. y CHANG, Y.: J. Cell. Physiol.
84: 349 (1974)
- (85) LOWRY, O.H., ROSEMBROUGH, N.J., FARRAND, A.L. y
RANDALL, R.J.: J. Biol. Chem. 193: 265 (1951)
- (86) McCOY, T.A., MAXWELL, M. y KRUSE, P.F.: Proc. Soc. Exptl.
Biol. Med. 100: 115 (1959)
- (87) McEWEN, C.R.: Anal. Biochem. 20: 114 (1967)

- (88) MACDONALD, H.R. y MILLER, R.G.: Biophys. J. 10(9) 834
(1970)
- (89) MEJBAUM, W.: Z. Physiol. Chem. 258: 117 (1939)
- (90) MILLONIG, G.: J. Appl. Phys. 32: 1637 (1961)
- (91) MILLONIG, G.: Proc. 5 th. Intern. Congres. Electron Microscopy
vol. 2 A.P.N.Y. (1962) p. 8.
- (92) MORGAN, J.F.: Cancer Cells in Culture. (Ed. H. Katsuta) A.P.
(1968) p. 48.
- (93) MUNRO, A.J., JACKSON, R.J. y KORNER, A.: Biochem. J.
92: 289 (1964)
- (94) MORGAN, J.F.: J. Nat. Cancer Inst. 44: 623 (1970)
- (95) NAORA, H. y KODAIRA, K.: Biochim. Biophys. Acta 224: 498
(1970)
- (96) NÄSLUND, P.H y HULTIN, T.: Biochem. Biophys, Acta 204: 237
(1970).
- (97) NEWTON, A.A.: Synchrony in Cell Division and Growth (ed. E.
Zenthen) Interscience P. (1964) p. 441 y 601
- (98) NOMURA, M.: Bacteriol. Rev. 34: 228 (1970)
- (99) OLSNES, S.: Eur. J. Biochem. 15: 464 (1970)

- (100) OLSNES, S.: Biochim. Biophys. Acta 232: 705 (1971)
- (101) OLSNES, S.: Eur. J. Biochem. 18: 242 (1971)
- (102) PALADE, G.E.: J. Exp. Med. 95: 285 (1952)
- (103) PALADE, G.E.: Microsomal Particles Protein Synthesis. Pap. Symp. 1st. Biophys. Soc. (1958) p.36.
- (104) PENMAN, S., BECKER, Y. y DARNELL, J.E.: J. Mol. Biol. 8:541 (1964)
- (105) PENMAN, S., GREENBERG, H. y WILLEMS, M.: Fundamental Techniques in Virology (Ed. K. Habel. y N.P. Salzman) A.P. (1969) p. 49.
- (106) PENMAN, S., SCHERRER, K., BECKER, Y. y DARNELL, J.E.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 49: 654 (1963)
- (107) PERRY, R.P. y KELLEY, D.E.: J. Mol. Biol. 35: 37 (1968)
- (108) PETERS, T. Jn.: J. Biol. Chem. 237: 1186 (1962)
- (109) PIERCE, C.H., DUBOS, R.J. y SCHAEFER, W.B.: J. Exptl. Med. 79: 189 (1953)
- (110) PRETLOW, T.G.: Anal. Biochem. 41: 248 (1971)
- (111) PRETLOW, T.G. y BOONE, C.W.: Exp. Mol. Path. 11: 139 (1969)

- (112) PUCK, T.T. y KAO, F.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 58: 1227 (1967)
- (113) QUASTLER, H., SHERMAN, F.S.: Exptl. Cell Res. 17: 420 (1959)
- (114) REDMAN, C.M.: J. Biol. Chem. 244: 4308 (1969)
- (115) REYNOLDS, E.S.: J. Cell Biol. 17: 208 (1963)
- (116) ROBBINS, E. y MARGUS, F.I.: Science 144: 1152 (1964)
- (117) ROLLESTON, F.S.: Biochem. J. 129: 721 (1972)
- (118) ROSBASH, M.: J. Mol. Biol. 65: 413 (1972)
- (119) ROTH, J.S.: J. Biol. Chem. 231: 1085 (1958)
- (120) SALAS, M.: Interacciones Moleculares. Proyección Biológica. (A.M. Municio) (1974) p. 518
- (121) SALB, J.: Proc. Nat. Acad. U. S. 54: 1353 (1965)
- (122) SABATINI, D.D. y BLOBEL, G.: J. Cell Biol. 45: 146 (1970)
- (123) SARGENT, J.R. y CAMPBELL, P.N.: Biochem. J. 96: 134 (1965)
- (124) SARMA, D.S.R., VERNEY, E. y SIDRANSKY, K.H.: Lab. Invest. 27: 48 (1972)
- (125) SCHARFF, M.D. y ROBBINS, E.: Science 151: 992 (1966)

- (126) SCHMIDT-THANNHAUSSER, versión de: MUNRO, H.N. y FLECK, A.
Methods of Biochemical Analysis. Interscience Pub. Vol. 14 (1966)
p.159.
- (127) SCHREIER, M.H. y NOLL, H.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68
(4): 805 (1971)
- (128) STAEHELIN, T.: Nature, 201: 264 (1964)
- (129) STEIN, J.L., THRALL, C.L., PARK, W.D., MANS, R.J., y
STEIN, G.S.: Science 189 (4202): 557 (1975)
- (130) STEWARD, D.L. y SHAEFFER, J.R.: Science 161: 791 (1968)
- (131) STEWART, J.W., SHERMAN, F., JACKSON, M., THOMAS, F.L.X.
y SHIPMAN, N.: J. Mol. Biol. 68: 83 (1972)
- (132) STUBBLEFIELD, E.: Methods in Cell Physiology. Vol III (Ed. D.M.
Prescott) A.P.N.Y. (1968) p.25.
- (133) TAKAHASHI, Y.: J. Theor. Biol. 13: 202 (1966)
- (134) TATA, J.R.: Acta Endocrinol. Suppl. 180: 192 (1973)
- (135) TERASIMA, T y TOLMACH, L.J.: Exp. Cell. Res. 30: 344 (1963)
- (136) TJIO, J.H. y PUCK, T.T.: J. Exp. Med. 108: 259 (1958)
- (137) TOBIA, A.M., SCHILKRAUT, C.L. y MAIO, J.J.: J. Mol. Biol.
54: 499 (1970)

- (138) TOOZE, J.: Cold Spring Harbor Lab. New York. (1973) p.74.
- (139) VALLADARES, Y. y ALVAREZ, Y.: Rev. Esp. Oncol. 20: 102
(1973)
- (140) VENROIJ, W.J.W.van, HENSHAW, E. C., HIRSCH, C.A.: J.Biol.
Chem. 245: 5947 (1970)
- (141) XEROS, N.: Nature 194: 682 (1962)
- (142) WARNER, J.R., RICH, A. y HALL, C.E.: Science, N.Y. 138:
1399 (1962)
- (143) WEBB, T.E., BLOBEL, G. y POTTER, V.R.: Cancer Res. 24:
1229 (1964)
- (144) WETTSTEIN, F.O., STAEHELIN, T. y NOLL, H.: Nature, London
197: 430 (1963)
- (145) WILLIAMSON, A.R.: Eassays in Biochem. Vol. 5 (1969) p.139.
- (146) WINGE, Ö.: Ztschr. Zellforsch u. mikr. Anat. 10: 683 (1930)
- (147) ZYLBER, E.A. y PENMAN, S.: Biochim. Biophys. Acta 204: 221
(1970)